

**Untersuchungen zu Phenoloxidasen
aus Zellkulturen von
Lycopersicon esculentum Mill.**

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

dem
Fachbereich
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Marc Leuschner
aus St. Tönis

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am:	18.Dezember 2002
Erstgutachterin:	Prof. Dr. M. Petersen
Zweitgutachterin:	Prof. Dr. B. Dräger
Tag der mündlichen Prüfung am:	18.Dezember 2002

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Pflanzliche Sekundärstoffe	1
1.2 Pflanzliche Zellkulturen	1
1.3 <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	2
1.4 Zellkulturen von <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	4
1.5 Phenylpropanstoffwechsel	6
1.6 Laccasen	7
2 Material und Methoden	8
2.1. Zellkulturen und Inhaltsstoffe	8
2.1.1 Zellkulturen	8
2.1.1.1 Anlegen von Kalluskulturen	8
2.1.1.2 Suspensionskulturen von <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	8
2.1.1.3 Charakterisierung der Tomatenzellkulturen	9
2.1.2 Inhaltsstoffanalyse	10
2.1.2.1 Extraktion phenolischer Substanzen	10
2.1.2.2 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	10
2.1.2.3 Saure Hydrolyse	11
2.1.2.4 Enzymatische Aufspaltung glykosidierter Verbindungen	11
2.2 Enzymaufarbeitung und Proteinreinigung	12
2.2.1 Enzymaufarbeitung	12
2.2.1.1 Mikrosomen-Präparation	12
2.2.1.2 p-Cumarsäure 3-Hydroxylase Tests	12
2.2.1.3 Herstellung des Enzymrohextrakts	13
2.2.1.4 Proteinbestimmung nach Bradford	13
2.2.1.5 Enzymtestansatz für den Rohextrakt	13
2.2.1.6 HPLC-Analyse der Proben aus Enzymtests	13
2.2.1.7 pH-Abhängigkeit	14
2.2.1.8 Hemmung der enzymatischen Kaffeesäurebildung	14
2.2.1.9 Zellaufschluß mit Ultraturrax	15
2.2.1.10 Ammoniumsulfatfällung	15
2.2.1.11 Bestimmung der Monophenolaseaktivität	15
2.2.1.12 Untersuchung zur Substratspezifität	16
2.2.2 Proteinreinigung	17
2.2.2.1 Anionenaustauschchromatographie	17
2.2.2.2 Hydroxylapatit	17
2.2.2.3 Enzymtestansatz für FPLC-Fraktionen	18
2.2.2.4 Diphenolase-Test	18
2.3 Elektrophorese	18
2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.3.1.1 SDS-Polyacrylamidgel	19
2.3.1.2 Polyacrylamidgel nativ	20
2.3.1.3 Enzymreaktion nach der Gelelektrophorese	21

2.4 Molekularbiologie	21
2.4.1 RNA-Isolierung und Hybridisierung	21
2.4.1.1 3'-labeling von Oligonucleotiden	21
2.4.1.2 RNA-Isolation aus <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	22
2.4.1.3 RNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese	22
2.4.1.4 Northern-Blot	23
2.4.1.5 Northern-Hybridisierung	23
2.4.1.6 Detektion der gebundenen Sonden	23
2.4.1.7 Pufferlösungen	23
2.4.2 PCR	24
2.4.2.1 Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA	24
2.4.2.2 Polymerase Kettenreaktion	24
2.4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Ansätze	25
2.4.3 Klonierung	26
2.4.3.1 Isolierung der PCR-Fragmente aus Agarosegel	26
2.4.3.2 Klonierung von PCR-Fragmenten	26
2.4.3.3 Modifizierung der Enden der PCR-Fragmente	26
2.4.3.4 Ligation	27
2.4.3.5 Transformation	27
2.4.3.6 LB-Agar-Medium für Bakterien	27
2.4.3.7 Selektion positiver Kolonien	27
2.4.3.8 Plasmidreinigung	28
2.4.3.9 Restriktionsverdau der Plasmide mit <i>Eco</i> RI	28
2.5 Chemikalien und Geräte	28
2.5.1 Chemikalien	28
2.5.1 Geräte	30
3 Ergebnisse	32
3.1 Inhaltsstoffanalytik der Tomatenzellkulturen	32
3.1.1 Säurehydrolyse der Hydroxyzimtsäureester	32
3.1.2 Enzymatische Glucoseabspaltung	33
3.2 Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen	36
3.2.1 Wachstum der beiden Tomatenzellkulturen	36
3.2.2 Veränderung der Kulturmedien	37
3.2.3 Bestimmung der Monophenolaseaktivität im Kulturverlauf	40
3.3 Mikrosomale p-Cumarsäure 3-Hydroxylasen	43
3.4 Bestimmung der Enzymparameter der Monophenolasereaktion	45
3.4.1 Bestimmung des pH-Optimums	45
3.4.2 Temperaturabhängigkeit der PPOs aus beiden Tomatenzelllinien	47
3.4.3 Monophenolaseaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer	49
3.4.4 Hemmung der Monophenolaseaktivität	51
3.4.5 Bestimmung der apparenten K_m -Werte	55
3.4.5.1 Nicht-transgene Kultur: Bestimmung des apparenten K_m -Werts für p-Cumarsäure	55
3.4.5.2 Transgene Kultur: Bestimmung des apparenten K_m -Werts für p-Cumarsäure	56
3.5 Untersuchung zur Substratspezifität der PPOs	58

3.6 Proteinreinigung	60
3.6.1 Proteinreinigung der PPOs der nicht-transgenen Kultur	60
3.6.1.1 Isoformtrennung	60
3.6.1.2 Hydroxylapatit-Chromatographie der „sauren Isoform“	61
3.6.1.3 Hydroxylapatit-Chromatographie der „neutralen Isoform“	62
3.6.2 PPO-Isoformtrennung des Enzymextrakts der transgenen Tomatenzellkultur	64
3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der partiell gereinigten Isoformen	65
3.6.4 Bestimmung der Diphenolaseaktivität	66
3.7 RT-PCR	67
4 Diskussion	69
4.1 Inhaltsstoffanalytik	69
4.2 Mikrosomale p-Cumarsäure 3-Hydroxylasen	70
4.3 Enzymparameter	70
4.4 Bestimmung des apparenten K_m -Wert für p-Cumarsäure	72
4.5 Substratspezifität der PPOs	73
4.6 Hemmung der Monophenolaseaktivität	74
4.7 Proteinreinigung	75
4.7.1 Proteinreinigung der Polyphenoloxidasen aus Tomatenzellkulturen	75
4.7.2 Diphenolaseaktivität	77
4.7.3 RT-PCR	77
4.8 Charakterisierung der beiden Tomatenzelllinien	77
4.8.1 Veränderung der Kulturmedien	78
4.8.2 Monophenolaseaktivität im Kulturverlauf	78
4.9 Rolle der PPOs in Pflanzen	79
5 Zusammenfassung	82
6 Literaturverzeichnis	84

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Phenylpropanstoffwechsel in zwei *Lycopersicon esculentum* Mill. Zelllinien durchgeführt. Eine der Zelllinien enthält ein Phenoloxidase (PPO)-Antisense-Konstrukt aus *Solanum tuberosum*, wodurch die Expression der PPO-Genfamilie herabgesetzt wurde (Thipyapong et al., 1997 b). Aus dieser und der genetisch nicht veränderten Zelllinie sollten Enzyme charakterisiert werden, die die Umsetzung der p-Cumarsäure zur Kaffeesäure katalysieren.

Es wurden zunächst die Gehalte einiger phenolischer Inhaltsstoffe der beiden Tomatenzelllinien bestimmt. In beiden Zelllinien liegen größere Mengen Chlorogensäure vor, ein charakteristischer phenolischer Inhaltsstoff von Tomaten. In der transgenen Zelllinie wurden 520 nmol/g TG und in der nicht-transgenen Zelllinie 278 nmol/g TG bestimmt. Die transgene Zelllinie enthält ebenfalls größere Mengen p-Cumarsäure (117 nmol/g TG) und Ferulasäure (60 nmol/g TG). In der nicht-transgenen Kultur ist keine p-Cumarsäure im methanolischen Extrakt zu detektieren, wohingegen die Menge an Ferulasäure (104 nmol/g TG) deutlich höher liegt als in der transgenen Kultur. Nach einer Glucosidase-Behandlung der Extrakte oder einer sauren Hydrolyse zeigte sich ebenfalls, dass in der nicht-transgenen Kultur mehr Ferulasäureverbindungen enthalten sind als in der transgenen Kultur, in der mehr p-Cumarsäureverbindungen vorliegen. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der verringerten Expression der PPOs in der transgenen Kultur und den geringeren Gehalten an Ferulasäureverbindungen.

Es wurde ein Enzymtest für PPOs etabliert, bei dem p-Cumarsäure als Substrat verwendet wurde. Es wurde die Zeitabhängigkeit der Monophenolasereaktion für eine Hydroxylierung von p-Cumarsäure zu Kaffeesäure ermittelt, der einen für die Monophenolasereaktion typischen sigmoiden Verlauf zeigte. Die Temperaturoptima für die Monophenolaseaktivität wurden bestimmt. Für die PPOs aus der transgenen Kultur wurde ein Optimum von 35°C ermittelt und für die PPOs aus der nicht-transgenen Kultur von 45°C. Für die PPOs aus der nicht-transgenen Kultur ergab sich ein apparenter K_m -Wert für p-Cumarsäure von 101 μ M und für die PPOs aus der transgenen Kultur von 46 μ M. Diese K_m -Werte zeigen, dass eine hohe Affinität zwischen dem Substrat und den PPOs besteht. Bei der Ermittlung des pH-Optimums ergab sich für die nicht-transgene Kultur ein Optimum bei pH 4,5 („saure Isoform“) und eine bei pH 7,5 („neutrale Isoform“). Diese pH-Optima ließen sich je einer PPO-Isoform zuordnen. In der transgenen Kultur konnte nur eine PPO-Isoform mit einem pH-Optimum von pH 4,5 ermittelt werden. Die PPOs ließen sich durch Tropolon hemmen. Bei 80 μ M Tropolon im Reaktionsansatz sank die Monophenolaseaktivität auf 10%. Ebenfalls konnte die Monophenolasereaktion durch DTT und DIECA stark gehemmt werden, EDTA dagegen begünstigte die Reaktion. Die Substratspezifität für Monophenole wurde untersucht: neben p-Cumarsäure wurde auch p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat, p-Cumarylchinasäure und 4-Hydroxyphenyllactat zu den entsprechenden Dihydroxyverbindungen umgesetzt. Die Substratspezifität der PPOs ist daher eher als gering einzustufen.

Im Rahmen einer Charakterisierung der beiden Tomatenzellkulturen wurde festgestellt, dass bis zum 5./6. Tag der Kulturperiode der Zucker im Medium verbraucht ist. Die Kulturen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der stationären Wachstumsphase und gehen langsam ab

dem 7. Tag in die Absterbephase über. Dies wird auch durch die ermittelten Wachstumskurven für Frischgewicht und Trockengewicht belegt, wie auch durch die Leitfähigkeit des Mediums. Die Monophenolaseaktivität im Kulturverlauf ergab, dass die „saure Isoform“ bereits zu Beginn der Kulturperiode aktiv ist, wohingegen die Monophenolaseaktivität der „neutralen Isoform“ erst gegen Ende der Kulturperiode, mit dem Beginn der Absterbephase der Kultur, auftritt.

Es gelang auch, die PPO-Isoformen zu trennen und partiell zu reinigen. Es konnten aus der nicht-transgenen Tomatenzelllinie zwei PPO-Isoformen isoliert und über Anionenaustauschchromatographie getrennt werden, die die Umsetzung von der p-Cumarsäure zur Kaffeesäure bei zwei verschiedenen pH-Werten katalysieren. Eine Isoform katalysierte diese Umsetzung bei einem pH-Wert von 4,5 („saure Isoform“) und die andere bei einem pH-Wert von 7,5 („neutrale Isoform“). In der transgenen Kultur wurde die saure Isoform aufgereinigt, die neutrale PPO-Isoform kommt in der transgenen Kultur nicht vor. Nach einer SDS-Gelelektrophorese sind in der Fraktion mit der angereinigten „sauren Isoform“ noch zwei Proteinbanden mit Molekülmassen von 78 kDa und 60 kDa zu erkennen und in der Fraktion mit der angereinigten „neutralen Isoform“ drei Proteinbanden mit Molekülmassen von 78 kDa, 60 kDa und 52 kDa. Es wurde Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR mit Primern durchgeführt, die für Teile einer PPO-Gen-Sequenz spezifisch waren. Die PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese analysiert und besaßen die theoretisch zu erwartende Länge, womit belegt werden konnte, dass zu dem Zeitpunkt, an dem die Enzymextraktionen durchgeführt wurden, PPO-mRNA exprimiert wurde.

1 Einleitung

1.1 Pflanzliche Sekundärstoffe

Bei Sekundärstoffen (Richter, 1996) handelt es sich zumeist um Verbindungen deren Vorkommen oft auf wenige Familien oder Arten beschränkt ist. Historisch wurden Sekundärstoffe meist als Exkretverbindungen eingestuft, die irgendwo in der Pflanze gelagert wurden und keine weitere Funktion haben. Dies erwies sich jedoch als Irrtum.

Sekundärstoffe übernehmen in Pflanzen vielfältige Aufgaben wie zur Fraßabwehr oder auch zur Pathogenabwehr bei Befall durch Pilze, Viren oder auch Bakterien. Eine weitere Rolle spielen Sekundärstoffe auch bei der Interaktion der Pflanze mit der Umwelt. Um Insekten zur Bestäubung anzulocken, werden beispielsweise Duftstoffe eingesetzt, die zumeist Monoterpene sind. Monoterpene gehören zu den Isoprenoïden, die im Chloroplasten synthetisiert werden. Isopren ist aus 5 C-Atomen aufgebaut, und durch Verknüpfung dieser Isopreneinheiten werden beispielsweise Monoterpene (C₁₀), Sesquiterpene (C₁₅), Diterpene (C₂₀) synthetisiert, bis hin zu Polyterpenen wie Kautschuk. Die Monoterpene zeichnen sich durch eine strukturelle Vielfalt aus, die sich bereits am Grundgerüst manifestiert. Es gibt sowohl offenkettige Monoterpene wie Citral, der Hauptkomponente des ätherischen Öls der Melisse, als auch Monoterpene mit einem geschlossenem Ring wie Menthol, dem charakteristischen Inhaltsstoff des ätherischen Öls von *Mentha x piperita*.

Die Phenole in Pflanzen bilden ebenfalls wie die Isoprenoïde eine große, strukturell ebenfalls sehr heterogene Gruppe. Die Grundstrukturen, aus denen diese unterschiedlichen Phenole aufgebaut sind stammen in erster Linie aus dem Shikimatweg und dem anschließenden Phenylpropanstoffwechsel (s.a. 1.5). Lignane sind Produkte des Phenylpropanstoffwechsels die auch aus pharmazeutischer Sicht von Interesse sind. Das Podophyllotoxin ist ein Mitosehemmstoff, der durch Anbindung an Tubulin-Monomere die Ausbildung von Mikrotubuli behindert (Imbert, 1998). Ein direkter Einsatz des Podophyllotoxins als Krebstherapeutikum ist allerdings wegen der hohen Toxizität für den Menschen nicht möglich. Daher werden semisynthetische Derivate des Podophyllotoxins, wie Teniposid und Etoposid, eingesetzt, die für den Menschen weniger toxisch sind. Eine weitere Gruppe der Phenylpropanderivate sind die Flavonoïde und Anthocyane, die die unterschiedlichsten Blütenfärbungen hervorrufen. Flavonoïde sind beispielsweise zumeist gelbe Farbstoffe und Anthocyane rote bis blaue. Diese auffälligen Färbungen der Blüten dienen der Anlockung von Insekten zum Zwecke der Bestäubung.

1.2 Pflanzliche Zellkulturen

Die pflanzliche Zellkulturforschung erlebte ihren Durchbruch in den dreißiger Jahren, als es gelang, Kalluskulturen der Karotte zu etablieren (Seitz et al., 1985). Aus sterilisierten Pflanzenorganen oder Gewebestücken läßt sich auf einem Nährmedium mit einer geeigneten Konzentration an Auxinen und Cytokininen eine Kallusbildung induzieren. Ein Kallus ist eine Masse uniformer dedifferenzierter Zellen, die auf einem festen Nährmedium wachsen. Im Jahre 1954 etablierten Muir et al. Zellsuspensionskulturen. Murashige und Skoog

entwickelten 1962 ein noch heute häufig genutztes Nährmedium. Gamborg et al. (1968) und Linsmaier und Skoog (1965) entwickelten weitere Nährmedien für pflanzliche Zellkulturen.

Zellkulturen können zur Gewinnung von pflanzlichen Sekundärstoffen genutzt werden. Da Sekundärstoffe oft in nur sehr geringen Konzentrationen in den Pflanzen vorkommen, können pflanzliche Zellkulturen dazu genutzt werden, Sekundärstoffe in größeren Mengen zu produzieren. Beispiele für eine Nutzung der pflanzlichen Zellkulturen im industriellen Maßstab sind die Produktion von Shikonin und von Taxol. Shikonin findet in Japan Verwendung als Wundheilmittel und wird aus Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* gewonnen. Der Shikoningehalt kann bis zu 21 % des Trockengewichtes erreichen (Takahashi und Fujita, 1991). In jüngerer Zeit ist die Gewinnung von Taxol aus Zellkulturen von *Taxus spec.* gelungen. Taxol ist ein Mitosegift welches in der Krebsforschung eingesetzt wird. Oftmals reichern Zellkulturen allerdings die Sekundärstoffe nicht in genügendem Maße an oder produzieren die gewünschten Stoffe nicht mehr, aufgrund der fehlenden Differenzierung in bestimmte Gewebe. Es gibt auch die Möglichkeit einer Biotransformation. Durch die Zugabe eines bestimmten Substrats zur Nährlösung der Zellkultur, wird dieses in ein gewünschtes Produkt umgewandelt, zum Beispiel die Umwandlung von β -Methyldigitoxin in β -Methyldigoxin durch Zellkulturen von *Digitalis lanata* (Reinhard und Alfermann, 1980).

1.3 *Lycopersicon esculentum* Mill.

Die Pflanze *Lycopersicon esculentum* gehört zur Familie der Solanaceae, den Nachtschattengewächsen (Frohne und Pfänder, 1997). In dieser Familie gibt es zahlreiche Arznei- und Giftpflanzen, genauso wie auch Nahrungs- und Gewürzpflanzen. Eine der bekanntesten Vertreter der Arznei- und Giftpflanzen dürfte die Tollkirsche, *Atropa belladonna* sein, die als Hauptinhaltsstoff das Tropanalkaloid S-Hyoscyamin enthält (Rimpler, 1999). Das Racemat des Hyoscyamins wird Atropin genannt und wird als Antidot bei Cholinesterasevergiftungen eingesetzt. Eine weitere Verwendung findet das Atropin in der Augenheilkunde, wenn eine längere Akkomodationslähmung erreicht werden muß. Das S-Hyoscyamin ist typisch für die Gattungen *Atropa*, *Datura* und *Hyoscyamus*.

In den Gattungen *Solanum* und *Lycopersicon* befinden sich vor allem Steroidalkaloidglykoside, die jedoch eine deutlich geringere Giftwirkung aufweisen als die Tropanalkaloide. In der Kartoffel (*Solanum tuberosum*), deren Knolle eine der wichtigsten Grundnahrungsmittel ist, liegen diese Alkaloide in der ganzen Pflanze vor. Die höchsten Konzentrationen sind in den Keimen und der Blüte und die geringste in den Knollen, die als Kohlenhydratlieferant verwendet wird. Die Toxine befinden sich in der Knolle vor allem in der Schale und, wenn die Knollen auskeimen, in sehr hohen Konzentrationen in den Keimen.

Die Tomate, *Lycopersicon esculentum*, stammt ursprünglich aus dem Gebiet Ecuador und Chile in Südamerika. Bereits aus dem 5. Jahrhundert v. Chr. ist eine Nutzung der Tomate überliefert. Die Tomate ist bereits in Mexiko domestiziert worden, bevor die Spanier im 16. Jahrhundert das Land eroberten. Das Wort Tomate stammt aus dem Spanischen und dieses wiederum vom mexikanisch-indianischen Wort „tomatl“. Die Spanier brachten die Tomate dann auch nach Europa, wo sie allerdings erst ab dem späten 18. Jahrhundert als

Nahrungspflanze im Mittelmeerraum genutzt wurde. Heute ist sie eine der bedeutendsten Kulturpflanzen. Tomatenfrüchte sind mit einer Weltjahresproduktion von über 61 Millionen Tonnen (nach FAO Production Year Book 1987) das mengenmäßig wichtigste Gemüse.

Die Tomate ist eine stark verzweigte, einjährige Pflanze und ist zwischen 0,5 und 1,2 m lang (Hänsel et al., 1993). Die Laubblätter haben breite Stiele und sind unpaarig gefiedert. Die Blüten sind meist mehr als 5-zählige Wickel und haben eine gelbe Blumenkrone. Die Frucht ist beerenartig, groß, saftig und meist rot, und die Samen darin sind flach und nierenförmig. Die Wurzeln sind faserig.

Die Tomatenfrüchte bestehen zu über 90 % aus Wasser. Im Tomatenmark liegen unter anderem Glucose, Fructose, Citronensäure und Glutaminsäure vor. Ein wichtiger Inhaltsstoff ist das Carotinoid Lycopin, welches für die rote Farbe der Frucht verantwortlich ist. In der Frucht liegt auch das aus dem Isoprenoidstoffwechsel stammende Steroidalkaloid Tomatin vor. Es kommt in den Früchten in Gehalten von 36 – 72 mg/ 100 g Frischgewicht vor. Die höchsten Gehalte sind in den unreifen, grünen Früchten zu finden. Das Tomatin liegt auch in den anderen Pflanzenteilen vor, mit den höchsten Gehalten in den Blättern von bis zu 104 mg/ 100 g Frischgewicht. Das Tomatin dient in der Pflanze als Fraßschutz vor Insekten und schützt die Pflanze vor Pilzbefall (Richter, 1996).

Das Tomatin besitzt antibakterielle und fungistatische Wirkung. Es sind auch Anwendungen von Tomatenblättern in der Volksmedizin bekannt. In Indien wird ein Tee aus Tomatenblättern gegen Grippe eingesetzt, und auf Haiti werden Blattabkochungen gegen Entzündungen des Mund- und Rachenraums eingesetzt. Es ist jedoch keine Wirksamkeit dokumentiert und auch hinsichtlich der Dosierungen liegen keine genauen Informationen vor (Hänsel et al., 1993).

Allerdings ist in jüngster Zeit ein anderer Stoff aus Tomaten in den Blickpunkt hinsichtlich seiner pharmazeutischen Bedeutung gerückt (Bramley, 2000), das in Tomaten enthaltene Carotinod Lycopin. Carotinoide erfüllen im menschlichen Körper als Antioxidantien und Radikalfänger wichtige Aufgaben zur Krebsvorbeugung. Im menschlichen Plasma und in Geweben sind hauptsächlich fünf Carotinoide nachgewiesen worden. Neben dem α und β Carotin, dem Lutein, Zeaxanthin auch das in Tomaten vorkommendem Lycopin. Lycopin besitzt ein höheres antioxidatives Potential als andere Carotinoide (Mascio et al., 1989). Bohm und Bitsch (1999) zeigten, dass erhitzte und lipidreiche Speisen die Bioverfügbarkeit des Lycopins deutlich erhöhten. Insgesamt ist es noch nicht geklärt, ob Lycopin, die einzige Komponente mit krebsprotektiver Wirkung in Tomatenspeisen ist (Bramley, 2000). Es gibt zwar Hinweise, dass Lycopin in der Lage ist, biochemische Effekte in Ratten auszulösen (Breinholt et al., 2000), jedoch sind diese Effekte noch nicht eindeutig geklärt.

1.4 Zellkulturen von *Lycopersicon esculentum* Mill.

Die Tomatensamen, aus denen die Zellkulturen angelegt wurden, sind uns freundlicherweise von Dr. J.C. Steffens zur Verfügung gestellt worden. Es handelt sich um Samen der Sorte Moneymaker, wobei eine Linie ein Polyphenoloxidase(PPO)-Antisense-Konstrukt aus der Kartoffel enthält. Auf diese Weise wurde die Expression der gesamten PPO-Genfamilie stark reprimiert (Thipyapong et al., 1997 b).

Die Inaktivierung einer Genfamilie mit Hilfe der Antisense-technik funktioniert vermutlich über RNA-Interferenz (RNA-i). Die transkribierte antisense-RNA (Martens und Nellen, 2002) wird als fremd erkannt und in eine doppelsträngige RNA transkribiert und dann von doppelstrangspezifischen RNAsen (Dicer) erkannt und in circa 21 Basenpaar große Stücke small-interfering RNAs (si-RNAs) geschnitten. Diese si-RNAs können nach ihrer Entwindung sowohl den mRNA-Abbau in der antisense als auch sense Kaskade aktivieren.

Die PPO-Genfamilie (Newman et al., 1993) besteht aus sieben Genen (A;A';B;C;D;E;F). Die PPOs A, A' und C besitzen hydrophobe Domänen und könnten daher membranständige oder membranassoziierte Isoenzyme kodieren. Die Expression von PPO F ist beispielsweise durch mechanische Verwundung induzierbar, was auf eine Rolle in der pflanzlichen Abwehr hinweist. PPO B spielt eine Rolle in der Blütenentwicklung. Die Isoenzyme sind sowohl im Stroma der Plastiden als auch im Thylakoidlumen lokalisiert worden.

Phenolasen sind in der Lage, zwei verschiedene enzymatische Reaktionen zu katalysieren. Sie werden als Monophenolasereaktion und Diphenolasereaktion bezeichnet. Die Monophenolasereaktion benötigt als Substrat ein in para-Stellung hydroxyliertes Monophenol, das zu einem ortho-Diphenol hydroxyliert wird. Die Diphenolasereaktion oxidiert o-Diphenole zu Chinonen.

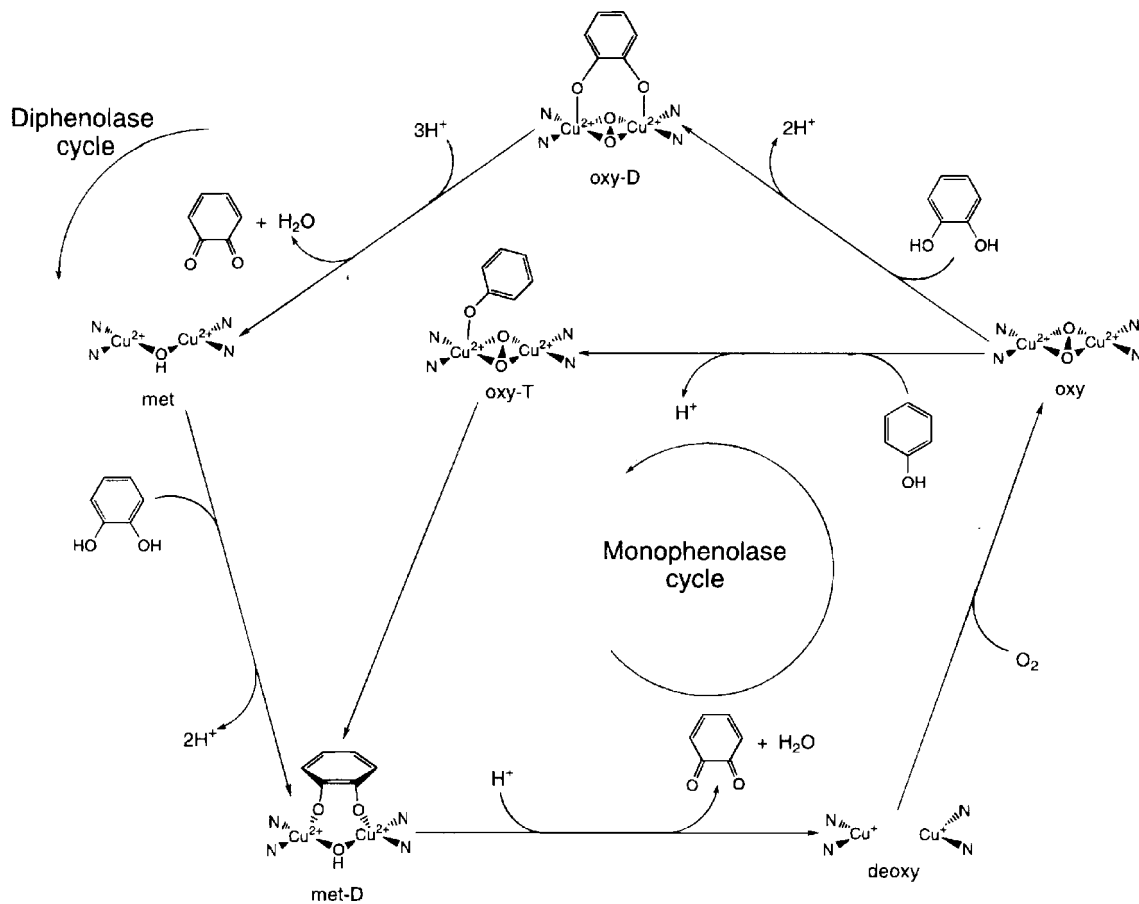


Abb. 1: Katalytischer Zyklus für die Hydroxylierung von Monophenolen und die Oxidation von o-Diphenolen zu o-Chinonen durch Phenolasen. Phenolasen können in der oxygenierten (oxy) Konformation sowohl eine Monophenolasereaktion als auch eine Diphenolasereaktion durchführen. In der met-Form können sie nur die Diphenolasereaktion katalysieren. Graphik entnommen aus Solomon et al. (1996).

Die Monophenolasereaktion kann nur durch die oxy-Form (Abb. 1) durchgeführt werden (Solomon et al., 1996; Fenoll et al., 2001; Rodriguez-Lopez et al., 2001). Ein Monophenol bindet mit der Hydroxygruppe an das Kupferion A (Solomon et al., 1996; Decker und Tuczek, 2000) im aktiven Zentrum der oxy-Form der PPOs und wird dabei so orientiert, dass in ortho-Position am phenolischen Ring eine Hydroxygruppe übertragen wird. Die dann wieder vorliegende deoxy-Form der PPOs muß nun wieder Sauerstoff binden um in die aktive oxy-Form überführt zu werden. Diese oxy-Form ist auch in der Lage Diphenole zu binden und zu den entsprechenden Chinonen zu oxidieren. Die daraus resultierende met-Form des Enzyms kann ein weiteres Diphenol oxidieren. Danach liegt das Enzym wieder in der deoxy-Form vor. Die Monophenolasereaktion zeichnet sich durch eine lag-Phase zu Beginn der Reaktion aus. Diese lag-Phase kommt dadurch zustande, dass die PPOs in erster Linie in der met-Form (Solomon et al., 1996) vorliegen und zunächst in die oxy-Form überführt werden müssen, um die Monophenolasereaktion zu katalysieren. Die Diphenolasereaktion weist diese lag-Phase nicht auf, da die Diphenole sowohl von der met-Form als auch von der oxy-Form der PPOs oxidiert werden können.

1.5 Phenylpropanstoffwechsel

Im Rahmen dieser Arbeit wurde p-Cumarsäure als Substrat verwendet. Die p-Cumarsäure entsteht im Rahmen des Phenylpropanstoffwechsels. Durch den Phenylpropanstoffwechsel werden einerseits die phenolischen Bestandteile des Lignins gebildet und andererseits die Ausgangssubstrate für andere phenolische Verbindungen wie zum Beispiel für die Lignane.

Ausgangssubstrat im Phenylpropanstoffwechsel (Abb. 2) ist die aus dem Shikimatweg stammende aromatische Aminosäure Phenylalanin. Der Shikimatweg ist in den Plastiden lokalisiert, es gibt jedoch auch Hinweise das ein zweiter Shikimatweg, entweder vollständig oder, wie es wohl wahrscheinlicher ist, teilweise im Cytosol lokalisiert ist (Richter, 1996). Die Produkte des Shikimatweges, die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin fließen entweder in die Proteinbiosynthese ein oder in Stoffwechselwege des pflanzlichen Phenolstoffwechsels, als Grundstruktur für aromatische Verbindungen. Die Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL), die Phenylalanin zu t-Zimtsäure umsetzt, unterliegt als Eingangsenzym diversen Regulationen. Die PAL (Richter, 1996) wird durch UV-Licht (blau), Elicitoren und Ethylen reguliert, die entweder Einfluß auf die mRNA Stabilität, Transkription oder die katalytische Aktivität nehmen. Die PAL ist vermutlich im Cytosol lokalisiert.

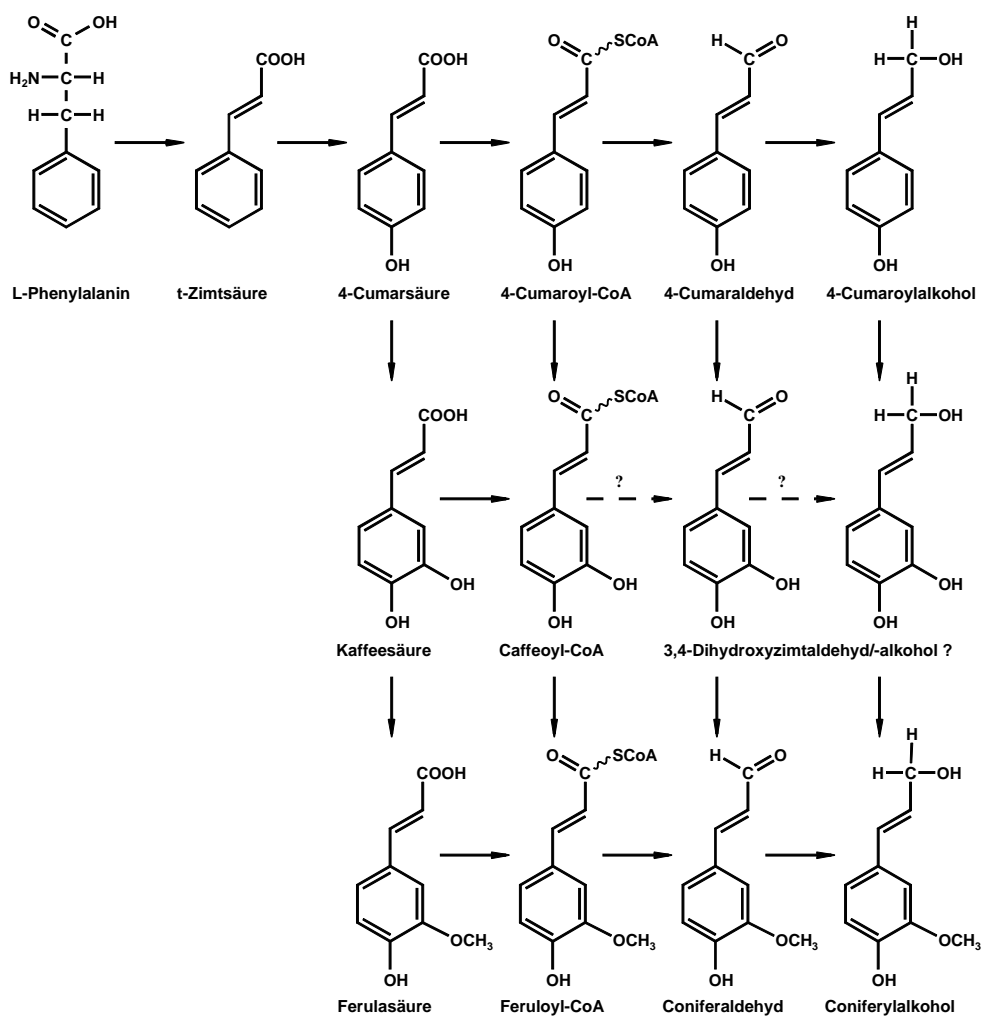


Abb. 2: Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel

Die Zimtsäure wiederum wird von der Zimtsäure 4-Hydroxylase, einem Cytochrom-P450 abhängigen Enzym (Pierrel et al., 1994), zu p-Cumarsäure umgesetzt. Die p-Cumarsäure wird in einigen Spezies durch die Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase (4CL) zu p-Cumaryl-CoA umgesetzt, welches zum Beispiel mit Chinasäure zu p-Cumarylchinasäure (Schoch et al., 2001) gekoppelt wird. Es wird nach der Kondensation der beiden Moleküle am phenolischen Ring in 3'-Stellung noch eine Hydroxylierung durchgeführt, so dass eine Kaffeesäuresubstitution vorliegt.

Eine der Hauptaufgaben des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels ist die Ligninsynthese. Lignine sind Polymere, die aus Zimtsäurederivaten aufgebaut sind. Sie härten Zellwände, die starker mechanischer Belastung unterliegen. Die Ligninbildung nimmt in der Regel mit dem Alter der Pflanze zu. Dies ist allerdings nicht die einzige Regulation, der die Ligninbildung unterworfen ist. Lignine werden aus Hydroxyphenyleinheiten (H), Guaiacyleinheiten (G) und Syringyleinheiten (S) aufgebaut. Prinzipiell finden sich die Hydroxyphenyleinheiten, die vom p-Cumaroylalkohol gebildet werden, in den jüngeren Geweben. Die Guaiacyleinheiten, die vom Coniferylalkohol stammen, in den jungen bis mittelalten Geweben und die Syringyleinheiten (Sinapylalkohol) in den mittelalten bis alten Geweben. Je höher der S-Anteil im Lignin ist, desto härter ist auch das resultierende Holz. Allerdings gibt es die unterschiedlichsten Zusammensetzungen und die weichholzigen Gymnospermen bauen beispielsweise gar keine Syringyleinheiten ins Lignin ein. Dieser deutlich unterschiedliche Einbau der Monolignole ins Lignin, vor allem das G/S-Verhältnis, im Verlaufe des Entwicklungszyklus (Parvathi et al., 2001) führte zu der Vermutung (Dixon et al., 2001), dass es zwei Synthesewege gibt, die sowohl unabhängig voneinander als auch gemeinsam ablaufen können. Zwei prinzipiell unabhängige Wege lassen sich besser und genauer regulieren als ein einziger, verzweigter Stoffwechselweg. Dixon et al. (2001) vermuten, dass eine Stoffwechselkanalisierung vorliegt, wobei durchaus einige Enzyme in beide Wege eingebunden sein können.

1.6 Laccasen

Laccasen sind Enzyme, die ebenfalls wie die PPOs phenolische Verbindungen oxidieren können. Bei den Laccasen handelt es sich um kupferhaltige Glykoproteine, die 60 – 70 kDa (Richter 1996) groß sind und Bestandteil lignifizierender Zellwände sind. Sie sind an der Polymerisation von Monolignolen beteiligt (Mayer und Staples, 2002). Ob Laccasen in Pflanzen auch eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen, ist noch unklar. Sehr ausführlich beschrieben und charakterisiert sind pflanzliche Laccasen aus *Rhus vernicifera* (Huttermann et al., 2001). Laccasen sind nicht nur bei höheren Pflanzen verbreitet, sondern auch bei Pilzen. Sie können auch bei biotechnologischen Prozessen eingesetzt werden. Immobilisierte Laccasen können verwendet werden (Servili et al., 2000), um aus dem Most der Weintrauben Phenole zu entfernen. Eine weitere Möglichkeit ist die Detektion von Morphin (Bauer et al., 1999), da Laccasen in der Lage sind Morphin zu oxidieren, aber kein Codein, kann über den bei der enzymatischen Reaktion entstehenden Sauerstoff Morphin in einer Probe detektiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturen und Inhaltsstoffanalyse

2.1.1 Zellkulturen

2.1.1.1 Anlegen von Kalluskulturen

Von zwei *Lycopersicon esculentum* Linien wurden Kalluskulturen angelegt. Diese wurden aus Samen generiert, die von zwei Tomatenlinien stammten, die J.C. Steffens in seinen Arbeiten verwendet hat und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Die Samen der beiden Stämme wurden in 1 ml 70% Ethanol für eine Minute entfettet und dann 12 min in einer 5% Chlorlösung desinfiziert. Daraufhin wurden die Samen dreimal mit sterilisiertem destilliertem Wasser gewaschen und für eine halbe Stunde gequollen. Zur Keimungsinduktion wurden die Samen auf CB-Medium ohne Phytohormone ausgelegt und im Dunkeln bei 26° C inkubiert (Petersen und Alfermann, 1988). Nach dem Einsetzen der Keimung wurden die Keimlinge in den Dauerlichtkulturraum gestellt.

Nach zwei Wochen wurden die ersten Keimlinge zerschnitten, und die Pflanzenteile wurden auf B5-Medium (Gamborg et al., 1968) ausgelegt. Ungefähr einen Monat später konnten die ersten Kallusbildungen beobachtet werden. Die Kallusbildung erfolgte sowohl an den Kotyledonen als auch an der Wurzel und den ausgelegten Sprossstücken.

Aus diesen Kalluskulturen wurden Suspensionskulturen angelegt.

2.1.1.2 Suspensionskulturen von *Lycopersicon esculentum* Mill.

Aus den Kalluskulturen wurden Suspensionskulturen angelegt, die in einem modifiziertem Nährmedium B5 (Gamborg et al., 1968) kultiviert werden (Tab. 1). Die Kulturen werden alle sieben Tage in frisches Nährmedium überführt, wobei 5 g Zellen mit einem perforiertem Löffel in frisches Medium eingewogen werden. Die Kultivierung erfolgt auf einem Schüttler bei 120 UpM und einer Temperatur von 26°C im Dunkeln.

	Saccharose	20 g/l
	myo-Inosit	100 mg/l
Makroelemente		
	KNO ₃	2,5 g/l
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,25 g/l
	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,172 g/l
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,15 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,134 g/l
	FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,026 g/l
	Na ₂ * EDTA * 2H ₂ O	0,034 g/l

Mikroelemente		
	H ₃ BO ₃	3 mg/l
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	3 mg/l
	MnSO ₄ * H ₂ O	1 mg/l
	KJ	0,75 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25 mg/l
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,25 mg/l
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,25 mg/l
Vitamine		
	Thiaminchloridhydrochlorid	100 µg/l
	Pyridoxinhydrochlorid	10 µg/l
	Nicotinsäure	10 µg/l
Hormone		
	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	1 mg/l
	Kinetin	0,1 mg/l
	6-Furfurylaminopurin	

Tab. 1: Bestandteile des modifizierten B5 Nährmediums nach Gamborg et al., (1968)

2.1.1.3 Charakterisierung der Tomatenzellkulturen

Die Charakterisierung der Tomatenzellsuspensionskulturen wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt. Es wurden dabei die Mediumsparameter Leitfähigkeit, Zuckergehalt und pH-Wert gemessen. Zur Charakterisierung des Wachstums der beiden Tomatenkulturen wurden das Frischgewicht und das Trockengewicht bestimmt. Die Leitfähigkeit wurde mit einer Leitfähigkeitselektrode gemessen und der Zuckergehalt mit einem Handrefraktometer bestimmt. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter ermittelt. Für diese Messungen wurde das Medium verwendet, von dem die Tomatenzellen vorher durch absaugen abgetrennt wurden. Diese abgesaugten Zellen wurden für die Frischgewichtsbestimmung gewogen. Ein Teil der Zellmasse wurde für die Bestimmung des Trockengewichts 48 Stunden bei -20°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet, der andere Teil wurde für die Enzymextraktion zur Bestimmung der Monophenolaseaktivität verwendet.

Die Monophenolaseaktivität der PPOs bei den pH-Werten 4,5 und 7,5 (Tab. 2 und 3) wurde in Proteinextrakten aus beiden Kulturen im Kulturverlauf bestimmt. Der Proteinextrakt wurde jeden Tag aus 5 g abgesaugten Tomatenzellen hergestellt. Der frisch hergestellte Extrakt wurde sofort für die Bestimmung der Monophenolaseaktivität verwendet.

Ansatz zur Bestimmung der Monophenolaseaktivitäten

10 µl	10 mM p-Cumarsäure (in 50% EtOH)
30 µl	1 M Ascorbinsäure/Na-Ascorbat pH 4,5
50 µl	Proteinextrakt
410 µl	0,1 M Na-Acetat pH 4,5

Tab. 2: Reaktionsansatz für einen pH-Wert von 4,5 im Enzymtest.

10 µl	10 mM p-Cumarsäure (in 50% EtOH)
30 µl	1 M Ascorbinsäure/Na-Ascorbat pH 4,5
50 µl	Proteinextrakt
410 µl	0,1 M Tris/HCl pH 8,5

Tab. 3: Reaktionsansatz für einen pH-Wert von 7,5 im Enzymtest.

Die Inkubationsdauer betrug 5 min bei 35 °C und wurde im Wasserbad durchgeführt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 6 N HCl abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden dreimal mit 500 µl Ethylacetat extrahiert, aufkonzentriert und über HPLC analysiert.

2.1.2 Inhaltsstoffanalyse

2.1.2.1 Extraktion von phenolischen Substanzen

Zur Extraktion der Kaffeesäureverbindungen aus Suspensionskulturen von *Lycopersicon esculentum* wurden die Zellen über einen Filter abgesaugt und 20-40 g Zellen eingewogen. Anschließend wurden die Zellen für 48 h bei -20° C eingefroren. Die gefrorenen Zellen wurden daraufhin für 48 h in einem Gefriertrockner lyophilisiert. Die getrockneten Zellen wurden zur Bestimmung des Trockengewichtes gewogen.

Zu je 0,5 g Zelltrockenmasse wurden 10 ml 80% Methanol gegeben und die Zellen in einem Mörser zerrieben. Mörser und Pistill wurden mit 5 ml 80% Methanol gespült. Die Proben wurden in verschlossenen Gefäßen 10 min bei 60°C im Ultraschallbad aufgeschlossen. Danach wurden die Proben 20 min bei 10.000 g abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und das Volumen bestimmt. Diese Extrakte wurden zur Analyse mittels HPLC verwendet.

2.1.2.2 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC (auch: High Performance Liquid Chromatography) ist ein Chromatographieverfahren, mit dem Moleküle über eine druckstabile Säule mit einem flüssigen Eluenten unter hohem Druck voneinander getrennt werden können.

Durch den hohen Druck kann eine höhere Geschwindigkeit und Trennschärfe erreicht werden. RP-HPLC bedeutet reversed phase und deutet darauf hin, dass die Säulenfüllung, also die stationäre Phase und die mobile Phase eine entgegengesetzte Polarität aufweisen, wobei die

stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar ist. Aus diesem Grund treten die Probensubstanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten unterschiedlich stark mit der stationären Phase in Wechselwirkung und werden so unterschiedlich stark verzögert. Die Detektion erfolgt häufig mit einem UV-Detektor bei einer bestimmten Wellenlänge, die für die gesuchte Substanz charakteristisch ist oder bei der organische Moleküle absorbieren.

Zur Analyse der Inhaltsstoffe mittels HPLC wurden die Proben in einem geeigneten Volumen mit 45% Methanol mit 0,01% Phosphorsäure verdünnt und mit einem Laufmittelgradienten (Tab. 4) analysiert. Als Trennsäule wurde eine Hypersil ODS (0,5 μm)-Säule (250 x 4 mm) mit einer entsprechenden 2 cm langen Vorsäule verwendet. Die mobile Phase setzte sich aus Wasser und Methanol zusammen. Das Laufmittel war ebenso wie das 45% Methanol, welches zum Rücklösen verwendet wurde, mit o-Phosphorsäure angesäuert. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min und die Detektionswellenlänge 290 nm.

Zeit [Minuten]	% Methanol
0	20
11	40
19	55
20	70
21	20
30	20

Tab.4: Gradientenprogramm für HPLC-Analyse

2.1.2.3 Saure Hydrolyse

Für die Hydrolyse wurden die Extrakte aus der beschriebenen methanolischen Extraktion verwendet. Es wurden 100 μl Extrakt (80% MeOH) mit 100 μl 6N HCl gemischt und in einem Wasserbad bis zu 30 min gekocht. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt und nach dem Abkühlen sofort mit 500 μl Ethylacetat gemischt. Die Proben wurden abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und die jeweiligen Überstände vereinigt.

Die vereinigten Überstände wurden getrocknet und bis zur späteren Analyse eingefroren.

2.1.2.4 Enzymatische Aufspaltung glykosidierter Verbindungen

Für die Behandlung mit β -Glucosidase aus Mandeln wurden 2 ml des 80% methanolischen Extrakts verwendet. Dieser wurde mit 6 ml bidestilliertem Wasser gemischt, und mit verdünnter Phosphorsäure wurde der pH-Wert auf 5 eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mg β -Glucosidase gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 35° C im Wasserbad. Zum Stoppen der Reaktion wurden 500 μl entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit vorgelegten 50 μl 6N HCl gegeben und auf Eis gestellt.

Die Hydrolyseprodukte wurden dreimal mit je 500 μl Ethylacetat ausgeschüttelt, getrocknet und eingefroren.

2.2 Enzymaufarbeitung und Proteinreinigung

2.2.1 Enzymaufarbeitung

2.2.1.1 Mikrosomen-Präparation

Für die Mikrosomenaufarbeitung (Pommer, 2000) wurden 7 Tage alte Zellsuspensionskulturen der beiden *Lycopersicon esculentum*-Stämme verwendet. Das Zellmaterial wurde über einen Büchnertrichter mit Filterpapier an einer Wasserstrahlpumpe vom Medium getrennt. Zu den abgesaugten Pflanzenzellen wurde 1/5 des Frischgewichtes an Polyvinylpyrrolidon (Polyclar 10) gegeben. Des weiteren wurde pro 1 g Zellen je 1 ml Extraktionspuffer gegeben. Als Extraktionspuffer wurde ein 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,6 mit frisch zugegebenem 1 mM Dithiotreitol (DTT) verwendet. Des weiteren wurde dem Extraktionspuffer noch 0,5 M Mannit zugegeben.

Der Extrakt wurde in einem mit Eis gekühlten Mörser homogenisiert. Das auf diese Weise erhaltene Homogenat wurde 20 min bei 4° C und 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Volumen bestimmt.

Dem Überstand wurde unter Rühren auf Eis 1 M MgCl₂-Lösung tropfenweise bis zu einer Konzentration von 50 mM zugegeben. Der Extrakt wurde dann noch 20 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde der Proteinextrakt 20 min bei 4° C und 48000 g zentrifugiert.

Das erhaltene Sediment wurde mit 1 ml Extraktionspuffer (ohne Mannit) gewaschen und dann in 3 ml Puffer resuspendiert. Die Mikrosomensuspension wurde, vor der Proteinbestimmung nach Bradford (1976), mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden 2 ml der Färbelösung mit 10 µl Mikrosomensuspension gemischt und deren Extinktion bei 595 nm nach 15 min gegen einen Leerwert mit Resuspendierungspuffer gemessen. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA; 1 mg/ml) verwendet.

2.2.1.2 p-Cumarsäure 3-Hydroxylase Tests

10	µl	NADPH (50 mM)
20	µl	10 mM p-Cumarsäure (in 50% Ethanol)
285	µl	Mikrosomenextrakt (0,25 mg Protein/ml im Test)
185	µl	0,1 M KPi-Puffer pH 7,6 / 1 mM DTT

Die Inkubation erfolgte bei 26° C im Wasserbad bis zu einer Dauer von 60 min. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 6 N HCl gestoppt und die Probe auf Eis gestellt. Daraufhin wurden je dreimal 500 µl Ethylacetat zugegeben, geschüttelt und zentrifugiert. Die Ethylacetatphasen wurden abgenommen, vereinigt und im Exsikkator getrocknet. Die getrockneten Proben wurden bis zur Analyse mittels HPLC bei -20° C eingefroren.

2.2.1.3 Herstellung des Enzymrohextrakts

Für die Enzymaufarbeitung wurden 7 oder 8 Tage alte Zellsuspensionskulturen der beiden *Lycopersicon esculentum* Stämme verwendet. Das Zellmaterial wurde über einen Büchnertrichter mit Filterpapier an einer Wasserstrahlpumpe vom Medium getrennt. Zu den abgesaugten Pflanzenzellen wurde 1/10 des Frischgewichtes an Polyvinylpyrrolidon (Polyclar 10) gegeben. Des weiteren wurde pro 1 g Zellen je 0,5 ml Extraktionspuffer gegeben. Als Extraktionspuffer wurde ein 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7 mit frisch zugegebenem 1 mM Dithiotreitol (DTT) verwendet.

Die Zellen wurden in einem eisgekühlten Mörser homogenisiert. Das auf diese Weise erhaltene Homogenat wurde 20 min bei 4° C mit 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Volumen bestimmt.

2.2.1.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Die mit bidestilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllte Färbelösung besteht aus 100 mg Coomassie-Brilliantblau G-250, 50 ml Ethanol 96 % p.a. und 100 ml 85% o-Phosphorsäure. Die erhaltene Lösung wurde zweimal filtriert.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden 2 ml der Färbelösung mit 10 µl Proteinlösung gemischt und deren Extinktion bei 595 nm nach 15 min gegen einen Leerwert mit dem entsprechenden Puffer gemessen. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA; 1mg/ml) verwendet.

2.2.1.5 Enzymtestansatz für den Rohextrakt

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde folgender Standardtest verwendet:

10	µl	0,5 M Ascorbinsäure
10	µl	10 mM p-Cumarsäure (in 50% Ethanol)
50	µl	Enzymrohextrakt (2 mg Protein/ml)
430	µl	0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7 (ohne DTT)

Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 35°C und wurde durch Zugabe von 50 µl 6N HCl gestoppt. Die Proben wurden auf Eis gestellt und dreimal mit 500 µl Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden im Exsikkator getrocknet und bis zur späteren Analyse mittels HPLC bei -20°C eingefroren.

2.2.1.6 HPLC-Analyse der Proben aus Enzymtests

Die Proben wurden für die HPLC-Analyse in 100 µl 45% Methanol mit 0,01% o-Phosphorsäure rückgelöst. Als Trennsäule wurde eine Hypersil ODS-Säule (250 mm x 4 mm) mit 0,5 µm großen Partikeln und als Laufmittel wurde 45% Methanol mit 0,01% o-

Phosphorsäure verwendet. Die Elution erfolgte isokratisch über eine Dauer von 10 min. Die Detektion der Substanzen erfolgte bei einer Wellenlänge von 320 nm.

2.2.1.7 pH-Abhängigkeit

Da sich herausgestellt hatte, dass, nachdem die Proteinrohextrakte über eine Sephadex G-25M Fertigsäule (PD 10) entsalzt worden waren, doch eine Abhängigkeit hinsichtlich der zum Enzymtest zugefügten Ascorbinsäuremenge ergab, wurden die pH-Abhängigkeiten der enzymatischen Reaktionen genauer untersucht.

Es wurde untersucht ob der bisher verwendete KPi-Puffer durch einen Natrium-Acetat-Puffer (NaAc-Puffer) ersetzt werden könnte. Da sich bei pH 7 keine Unterschiede hinsichtlich der Enzymaktivitäten in den beiden Zelllinien zeigte, wurde für die weiteren Enzymtests 0,1 M Na-Acetat-Puffer mit pH-Werten zwischen 3,5 und 8,0 hergestellt. Bei der zu den Enzymtests zugefügten Ascorbinsäure wurde ebenfalls mit Na-Ascorbat der entsprechende pH-Wert eingestellt.

Die zum Enzymtest zugefügte Ascorbinsäure wurde auch versuchsweise durch Na-Ascorbat oder durch Dehydroascorbinsäure ersetzt.

2.2.1.8 Hemmung der enzymatischen Kaffeesäurebildung

Es wurde versucht, die enzymatische Umsetzung der p-Cumarsäure zur Kaffeesäure zu hemmen. Als potentielle Hemmstoffe wurden Dithiotreitol (DTT), Diethyldithiocarbaminat (DIECA), Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Tropolon (Abb. 3) getestet. Es wurden zunächst Rohextrakte untersucht, die über eine Sephadex-Säule filtriert wurden und bei denen dann im Enzymtest eine Ascorbinsäurekonzentration von 50 mM eingestellt wurde. Des Weiteren wurde auch die gefällte Proteinfraction (40-60% Ammoniumsulfatsättigung) der nicht-transgenen Tomatenzelllinie getestet.

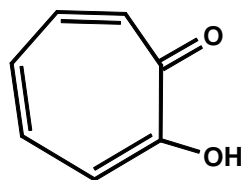


Abb. 3: Tropolon (2-Hydroxy-2,4,6-cycloheptatrienon)

2.2.1.9 Zellaufschluß mit Ultraturrax

Für die Enzymaufarbeitung wurden 7 oder 8 Tage alte Zellsuspensionskulturen der beiden *Lycopersicon esculentum* Stämme verwendet. Das Zellmaterial wurde über einen

Büchnertrichter mit Filterpapier an einer Wasserstrahlpumpe vom Medium getrennt. Zu den abgesaugten Pflanzenzellen wurde 1/10 des Frischgewichtes an Polyvinylpyrrolidon (Polyclar) gegeben. Des weiteren wurde pro 1 g Zellen je 0,5 ml Extraktionspuffer gegeben. Als Extraktionspuffer wurde ein 0,1 M Natrium-Acetat-Puffer pH 7 mit frisch zugegebenem 1 mM Dithiotreitol (DTT) verwendet.

Die Zellen wurden mit einem Ultra-Turrax dreimal für 30 s homogenisiert und dazwischen jeweils für 30 s auf Eis gekühlt. Das auf diese Weise erhaltene Homogenat wurde 20 min bei 4° C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen.

2.2.1.10 Ammoniumsulfatfällung

Für die weitere Aufkonzentrierung der Proteine wurde das Volumen der Rohextrakte bestimmt und eine Fällung mit kalter gesättigter Ammoniumsulfatlösung durchgeführt. Die Ammoniumsulfatlösung wurde unter ständigem Rühren tropfenweise zugegeben. Die gesamte Fällungsdauer betrug 30 min. Es wurde die Proteinfraction, die zwischen 40 und 75% Ammoniumsulfat-Sättigung ausfiel, verwendet.

Das ausgefällte Protein wurde 20 min bei 48.000 g und 4° C abzentrifugiert (Auslaufen der Zentrifuge ohne Bremse). Der erhaltene Niederschlag wurde in Puffer (0,1 M Na-Acetat-Puffer, pH 7,0 + 1 mM DTT) resuspendiert und über eine mit Resuspendierungspuffer äquilibrierte Sephadex G - 25M Fertigsäule (PD 10) entsalzt.

2.2.1.11 Bestimmung der Monophenolaseaktivität

Der standardisierte Enzymtestansatz mit einem Test-pH-Wert von 4,5 setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

30	µl	1 M Ascorbinsäure/Na-Ascorbat pH 4,5
10	µl	10 mM p-Cumarsäure (in 50% Ethanol)
25	µl	Enzymrohextrakt (2 mg Protein/ml)
435	µl	0,1 M Na-Acetat-Puffer pH 4,5 (ohne DTT)

Für einen pH-Wert im Reaktionsansatz von 7,5 sah das Pipettierschema folgendermaßen aus:

30	µl	1 M Ascorbinsäure/Na-Ascorbat pH 4,5
10	µl	10 mM p-Cumarsäure (in 50% Ethanol)
25	µl	Enzymrohextrakt (2 mg Protein/ml)
435	µl	0,1 M Tris/HCl pH 8,5 (ohne DTT)

Die Inkubation erfolgte 10 min bei 35°C im Wasserbad. Die Tests wurden durch Zugabe von 50 µl 6 N HCl gestoppt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben dreimal mit je

500 µl Ethylacetat extrahiert, getrocknet und zur späteren Analyse mittels HPLC bei -20°C eingefroren.

2.2.1.12 Untersuchung zur Substratspezifität

Es wurden verschiedene p-Hydroxyphenylderivate (Abb. 4) als potentielle Substrate der PPOs getestet.

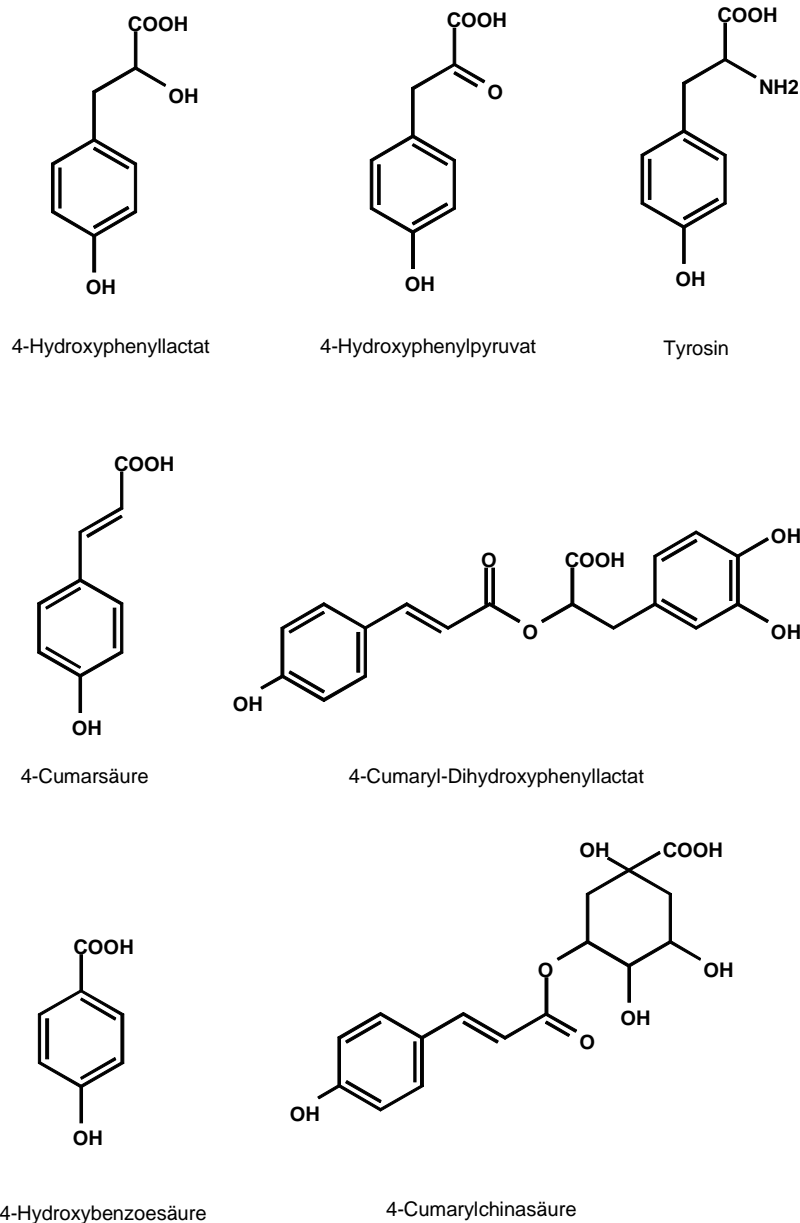


Abb. 4: Substrate, die getestet wurden für 3-Hydroxylierungen durch die PPO-Isoformen

2.2.2 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung wurde mit einem Waters 650 Advanced Protein Purification System durchgeführt.

2.2.2.1 Anionenaustauschchromatographie

Bei der Anionenaustauschchromatographie (Rehm, 2000) ist die Matrix des Säulenmaterials mit positiv geladenen Gruppen besetzt. Auf diese Weise treten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Gruppen der Proteine mit der Matrix der Säule auf. Die Stärke der Wechselwirkungen wird durch den pH-Wert und die Ionenstärke des Puffers auf der einen Seite und den isoelektrischen Punkt der verschiedenen Proteine auf der anderen Seite entscheidend beeinflusst.

Die Trennsäule enthielt den Anionentauscher Q-Sepharose Fast Flow. Die Säulendimensionen waren 95 x 15 mm. Das Puffersystem bestand aus einem 0,05 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 (Puffer A) zum Aufbringen der Proteine auf die Säule und einem identischen Elutionspuffer mit zusätzlich 1 M NaCl (Puffer B). Zum Eluieren der Proteine wurde die Natriumchloridkonzentration in der mobilen Phase linear auf 1 M erhöht (Tab. 6).

0-20 min	Puffer A
20-60 min linearer Gradient	Puffer A → B
60-80 min	Puffer B

Tab. 5: Gradientenprogramm für die Anionenaustauschchromatographie

In den gesammelten Fraktionen wurde die Monophenolaseaktivität bestimmt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und über Ammoniumsulfatfällung (75% Sättigung) konzentriert. Diese Proteinfraktionen wurden in 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 gelöst und einer weiteren Chromatographie unterzogen.

2.2.2.2 Hydroxylapatit

Als Säulenmaterial wurde Hydroxylapatit verwendet. Hydroxylapatit (Rehm, 2000) ist ein Calciumphosphatmineral bei dem saure Proteine über ihre Carboxylgruppen eine Komplexbindung mit dem Calcium des Minerals eingehen und basische Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen ihrer Aminogruppen mit der negativen Oberflächenladung des Minerals eine Bindung eingehen.

Die Säulendimensionen waren 105 x 5 mm. Das Puffersystem bestand aus 25 mM KPi-Puffer pH 7 (Puffer A) und 500 mM KPi-Puffer pH 7 (Puffer B) Es wurde dasselbe Gradientenprogramm (Tab. 5) verwendet wie bei der Anionenaustauschchromatographie. Die Elution erfolgte demnach durch ansteigende Phosphatkonzentrationen.

2.2.2.3 Enzymtestansatz für FPLC-Fractionen:

pH-Wert im Test 4,5:

10 µl	p-Cumarsäure 10 mM (in 50% EtOH)
30 µl	Ascorbinsäure/Na-Ascorbat 1 M pH 4,5
360 µl	Na-Acetat-Puffer 0,1 M pH 4,5
100 µl	Proteinlösung

pH-Wert im Test 7,5:

10 µl	p-Cumarsäure 10 mM (in 50% EtOH)
30 µl	Ascorbinsäure/Na-Ascorbat 1 M pH 4,5
360 µl	Tris/HCl 0,1 M pH 8,5
100 µl	Proteinlösung

Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 35°C im Wasserbad und wurde durch die Zugabe von 50 µl 6 N HCl gestoppt. Die Proben wurden auf Eis gestellt und anschließend dreimal mit je 500 µl Ethylacetat extrahiert, getrocknet und zur späteren Analyse mittels HPLC bei -20°C eingefroren.

2.2.2.4 Diphenolase-Test

Die Diphenolaseaktivität in beiden Kulturen wurden anhand der Umsetzung von Dihydroxyphenylalanin bestimmt (Tab. 6). Beim Versuchsansatz wurde gemäß Shin et al. (1997) vorgegangen. Die Enzymreaktion wurde bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt und die Absorptionsänderung bei 475 nm photometrisch gemessen.

300 µl	25 mM DOPA
75 µl	Proteinlösung (0,1mg/ml im Test)
1125 µl	0,1 M KPi-Puffer pH 6

Tab. 6: Standardisierter Ansatz für einen Diphenolasetest.

2.3 Elektrophorese

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung der Proteine aus den Enzymextrakten nach Ammoniumsulfatfällung wurde neben der Ionenaustauschchromatographie auch die Methodik der Gelelektrophorese verwendet. Das Ziel sollte sein, nach einer elektrophoretischen Trennung der Proteine eine enzymatische Reaktion im Gel ablaufen zu lassen und diese dann im Gel sichtbar zu machen (Angelton und Flurkey, 1984; Bischoff et al. 1998; Gabriel, 1971; Vaughan und Butt, 1969). Da nach Angelton und Flurkey (1984) eine enzymatische Reaktion nach einer SDS-PAGE bei

Phenolase aus Spinat stattfinden konnte, wurde dies auch bei Phenolase aus den beiden Tomatenzelllinien getestet. Die ersten Versuche wurden mit 10%igen SDS-PAGE-Gelen unternommen. Alternativ wurden auch Versuche mit nativen Polyacrylamidgelen gemacht. Bei diesen Gelen wurde die SDS-Lösung durch das gleiche Volumen Wasser ersetzt.

2.3.1.1 SDS-Polyacrylamidgel (10%)

Trenngel:	10% Acrylamid	
	15 ml	1.5 M Tris/HCl pH 8,8 (Trenngelpuffer)
	0,3 ml	20% SDS
	20 ml	30% Acrylamid + 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid
	23,8 ml	bidest. Wasser
	0,3 ml	5% TEMED-Lsg.
	0,6 ml	3% APS

Sammelgel:	5% Acrylamid	
	2,5 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (Sammelgelpuffer)
	0,1 ml	20% SDS
	3,35 ml	30% Acrylamid + 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid
	13,35 ml	bidest. Wasser
	0,1 ml	5% TEMED
	0,6 ml	3% APS

Elektrodenpuffer

Kathode:	0,025 M Tris	3,03 g/l
	0,192 M Glycin	14,41 g/l
	0,1% SDS	1,0 g/l
	pH 8,3 eingestellt mit Salzsäure	

Anode:	0,025 M Tris	3,03 g/l
	pH 8,3 eingestellt mit Salzsäure	

Probenpuffer (einfach):

6,25 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
10 ml	10% SDS
5 ml	50% Glycerin
0,0005% (w/v)	Bromphenolblau

auffüllen auf 50 ml mit Wasser und 8 mg/ml DTT zugeben

Probenbehandlung:

100 µl Probenlösung + 25 µl fünffachen Probenpuffer mischen,
3 min im Wasserbad (100°C) denaturieren,
125 µl auftragen

25 µl LMW-Marker + 25 µl einfachen Probenpuffer mischen,
3 min im Wasserbad (100°C) denaturieren,
50 µl auftragen

2.3.1.2 Polyacrylamidgel (10%) nativ**Trenngel:** 10% Acrylamid

15 ml	1.5 M Tris/HCl pH 8,8 (Trenngelpuffer)
20 ml	30% Acrylamid + 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid
24,1 ml	bidest. Wasser
0,3 ml	5% TEMED
0,6 ml	3% APS

Sammelgel: 5% Acrylamid

5 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (Sammelgelpuffer)
6,7 ml	30% Acrylamid + 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid
26,9 ml	bidest. Wasser
0,2 ml	5% TEMED
1,2 ml	3% APS

Elektrodenpuffer:

Kathode: 0,025 M Tris 3,03 g/l
0,192 M Glycin 14,41 g/l
pH 8,3 eingestellt mit Salzsäure

Anode: 0,025 M Tris 3,03 g/l
pH 8,3 eingestellt mit Salzsäure

Probenpuffer (einfach):

6,25 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
5 ml	50% Glycerin
0,0005% (w/v)	Bromphenolblau

auffüllen auf 50 ml mit Wasser und 8 mg/ml DTT zugeben

Probenbehandlung:

100 µl Proben-Lösung + 25 µl fünffachen Probenpuffer mischen,
125 µl auftragen

2.3.1.3 Enzymreaktion nach der Gelelektrophorese

Die Inkubation für den Phenolasenachweis im Gel wurde jeweils im Wasserbad bei 30°C durchgeführt. Dazu wurde das Gel in eine verschlossene Wanne auf Filterpapier gelegt, das mit der in Tab. 7 aufgeführten Reaktionslösung getränkt war. Es wurden Inkubationszeiten von 4 Stunden bis zu 18 Stunden getestet.

400 µM	p-Cumarsäure (50% Ethanol)
60 mM	Na-Ascorbat pH 4,5
0,5 M	Ammoniumsulfat
0,1 M	Na-Acetat-Puffer pH 4,5

Tab. 7: Konzentration der Substrate in der Reaktionslösung. Das Volumen der Inkubationslösung wurde so gewählt, dass die Filterpapiere gut von der Reaktionslösung durchtränkt waren.

Für die anschließende Färbereaktion (Vaughan und Butt, 1969) wurden 5% Essigsäure und 0,5% Natriumnitrit im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt, und das Gel darin bei 20°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktionsdauer betrug 5-10 min. Wenn Kaffeesäure im Gel vorliegt, wird diese zu einem roten Farbstoff umgesetzt. Dies wurde überprüft, indem ein Gelstück mit Kaffeesäure inkubiert wurde und anschließend die Färbereaktion durchgeführt wurde. Es entstand ein roter Farbstoff, der jedoch nicht stabil war.

2.4 Molekularbiologie**2.4.1 RNA-Isolierung und Hybridisierung****2.4.1.1 3'-labeling von Oligonucleotiden**

Die als Sonden verwendeten Oligonukleotide (PPO s und PPO as; s. S. 25 Tab. 8) wurden mit Digoxigenin-ddUTP markiert. Die benötigten Chemikalien wurden von der Firma Roche mitgeliefert. Zu 100 pmol des Oligonukleotids wurden 4 µl Reaktionspuffer, 4 µl CoCl₂-Lösung, 1 µl DIG-ddUTP Lösung und 1 µl (50 units) Terminale Transferase gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde mit sterilem Wasser auf 20 µl ergänzt und für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl einer 0,2 mM EDTA-Lösung pH 8 beendet.

Zu dem Markierungsansatz wurden 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl -20°C kaltes Ethanol zugegeben, der gesamte Ansatz gut gemischt und dann zur Fällung der Oligonukleotide 2 Stunden bei -20°C gelagert. Die gefällten Oligonukleotide wurden bei 0°C und 12.000 g

sedimentiert, das Sediment mit 50 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser gelöst. Bis zur späteren Verwendung wurden die markierten Oligonukleotide bei -20°C eingefroren.

2.4.1.2 RNA-Isolation aus *Lycopersicon esculentum* Mill.

Die RNA-Isolierung (Giuliano et al., 1993) wurde nach einer modifizierten Arbeitsanweisung von Martens (2000) durchgeführt. In jedem 2,2 ml Reaktionsgefäß werden 500 µl Extraktionspuffer, 3,5 µl β-Mercaptoethanol und 400 µl mit Wasser äquilibriertes Phenol (mit 0,1 M Citrat-Puffer pH 4,3 gesättigt) vorgelegt und auf Eis gekühlt. In jedes Reaktionsgefäß wird circa 0,2 g Pflanzenmaterial gegeben, das zuvor in flüssigen Stickstoff zermahlen wurde. Der Inhalt der Gefäße wird gut geschüttelt und dann 100 µl Chloroform zugegeben. Die Extrakte werden nun wieder gut gemischt bis sie milchig aussehen. Daraufhin werden sie für 20 min auf Eis inkubiert. Die Extrakte werden dann 30 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert und die Oberphasen abgenommen und in neue Gefäße überführt. In jeden Ansatz wird 1 Volumen Isopropanol zugegeben und die Extrakte wieder 20 – 60 Minuten auf Eis inkubiert. Die Nucleinsäuren werden 40 Minuten bei 15.000 g und 4°C präzipitiert, die Überstände verworfen und die Niederschläge an der Luft für einige Minuten getrocknet. Anschließend werden die Präzipitate in 500 µl TE-Puffer pH 7,5 vorsichtig resuspendiert. Nachdem 100 µl Ethanol zugegeben und die Proben 20 Minuten auf Eis inkubiert wurden, werden sie 20 Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert, um die Polysaccharide auszufällen.

Die Überstände werden in neue Gefäße überführt und die Nucleinsäuren durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Lithiumchlorid 30 bis 90 Minuten gefällt. Durch eine anschließende Zentrifugation für 30 Minuten bei 15.000 g und 4°C werden die Nucleinsäuren präzipitiert. Die Überstände werden verworfen. Die Niederschläge werden zweimal mit 500 µl 80 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation 15 min 10.000 g bei 4°C) und dann einige Minuten an der Luft getrocknet. Die getrockneten, gefällten Nucleinsäuren werden in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.4.1.3 RNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 2,4 g NEEO-Agarose in 125 ml destilliertem Wasser autoklaviert und nach dem Abkühlen auf circa 50°C mit 40 ml fünffachem MOPS-Elektrophoresepuffer und 35 ml 37% Formaldehyd gemischt und in die Gelform gegossen. Die RNA wurde mit 2 Vol. frisch hergestelltem Probenpuffer (250 µl Formamid, 83 µl 37% Formaldehyd, 50 µl zehnfacher MOPS-Elektrophoresepuffer und 0,01% (w/v) Bromphenolblau) gemischt. Für die Elektrophorese wurde einfacher MOPS-Puffer als Laufpuffer verwendet.

2.4.1.4 Northern-Blot

Die RNA-Gele wurden für 30 min in 0,05 M NaOH / 0,15 M NaCl – Lösung vorsichtig geschüttelt, um das Formaldehyd zu entfernen. Danach erfolgte eine 30 minütige Inkubation

des Gels in 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 mit 0,15 M NaCl. Dann wurde das RNA-Gel in zwanzigfachem SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0) geschüttelt. Die RNA wurde daraufhin über Kapillartransfer über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert. Als Transferpuffer wurde zwanzigfacher SSC-Puffer verwendet. Die Membran wurde nach dem Transfer an der Luft getrocknet und die RNA mittels UV-Licht auf der Membran fixiert.

2.4.1.5 Northern-Hybridisierung

Die Membran mit der fixierten RNA wurde 2 Stunden lang in Hybridisierungspuffer (2.4.1.7 Pufferlösungen) bei 55°C geschüttelt und dann über Nacht bei 50°C in Hybridisierungspuffer mit der Digoxigenin markierten Sonde (s. Kapitel: 2.4.1.1) inkubiert. Beide Lösungen wurden mehrfach verwendet.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran bei Hybridisierungstemperatur zweimal 5 min mit zweifachem SSC / 0,1% SDS und zweimal in halb-konzentriertem SSC mit 0,1% SDS gewaschen. Es wurde auch versucht die fixierte RNA bei 45°C mit den markierten Oligonucleotiden zu hybridisieren.

2.4.1.6 Detektion der gebundenen Sonden

Zunächst wurde die Membran 1 min in 0,1 M Maleinsäurepuffer / 0,15 M NaCl pH 7,5 bei Raumtemperatur geschüttelt und dann 30 min in Blockierungspuffer. Daraufhin wurde die Membran in Blockierungspuffer mit Digoxigenin-Antikörpern (Anti-Dig Fab AP; 75 mU) 1 Stunde geschüttelt. Der Blockierungspuffer und die Antikörperlösung wurden auch mehrfach verwendet.

Die Membran wurde dann zweimal 15 min in Maleinsäurepuffer gewaschen und daraufhin 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl pH 9,5 / 0,1 M NaCl) inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Membran in 40 ml 0,25 mM CSPD-Lösung (CSPD in Detektionspuffer) 2 min lang geschüttelt und danach sofort in Plastikfolie faltenfrei eingewickelt und in einer Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm (Lumifilm, Roche) in eine Kassette verpackt. Die Belichtungsdauer betrug 3 Stunden bei 37°C.

2.4.1.7 Pufferlösungen:

Zwanzigfacher SSC-Puffer:

3 M NaCl / 0,3 M Na-Citrat in 800 ml Wasser lösen und mit HCl den pH-Wert auf 7 einstellen. Anschließend das Volumen einstellen und die Lösung autoklavieren. Der zwanzigfach konzentrierte Puffer dient als Stammlösung für alle geringer konzentrierten SSC-Puffer.

Blockierungspuffer:

2 g Blocking-Reagenz in 200 ml Maleinsäurepuffer

Hybridisierungspuffer (500 ml):

35 g SDS; 0,5 g N-Laurylsarcosin; 100 ml 10 % Blocking Reagenz - Lösung; 50 mM Na - Phosphatpuffer; 5x SSC; 50% (v/v) Formamid

Maleinsäurepuffer:

0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl und mit fester Natronlauge den pH-Wert auf 7,5 einstellen

2.4.2 RT-PCR

2.4.2.1 Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA

Es wurde nach der Vorschrift der Firma MBI Fermentas für das Produkt „RevertAid“ vorgegangen.

5 µg	Gesamt-RNA
1 µl	Oligo dT-Primer
auf 12 µl auffüllen	Wasser

Die Ansätze werden vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Daraufhin werden die Ansätze 5 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Proben auf Eis abgekühlt und kurz sedimentiert.

Zu jedem Ansatz werden dann folgende Komponenten zugegeben:

4 µl	5x Reaktionspuffer
1 µl	RNase-Inhibitor
2 µl	10 mM dNTP-Mix

Der gesamte Ansatz wird vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wird 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben und für weitere 60 Minuten

bei 42°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Reaktion bei 70°C (10 Minuten) gestoppt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.4.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine der bedeutendsten Methoden in der Molekularbiologie. Es kann mit dieser Technik eine geringe Ausgangsmenge DNA vermehrt werden. Dazu wird die vorliegende DNA in einem Denaturierungsschritt bei 94°C in Einzelstränge getrennt. Die nun im Reaktionsgefäß vorliegende einzelsträngige DNA wird auf die optimierte Annealing-Temperatur abgekühlt, damit die zugefügten Oligonucleotidprimer mit den DNA-Strängen hybridisieren können. In einem Elongationsschritt bei 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase, werden die Primer verlängert, und auf diese Weise entsteht wieder doppelsträngige DNA. Dieser gesamte Vorgang wird mehrmals wiederholt und so die DNA in dem von den Primern begrenzten Bereich stark vermehrt.

Der Ansatz für die RT-PCR mit der *Taq*-Polymerase von MBI Fermentas besteht aus folgenden Komponenten:

5 µl	10x Puffer (ohne MgCl ₂ und (NH ₄) ₂ SO ₄)
4 µl	25 mM MgCl ₂
1 µl	10 mM dNTP
4 µl	cDNA
1 µl	Primer 1 (100 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (100 pmol/µl)
0,25 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
33,75 µl	Wasser (steril)
Gesamt 50 µl	

Die für die RT-PCR verwendeten Primer sind in Tab. 8 aufgelistet.

Sonde/ Primer		Sequenz
Ps 2	Sense	CC(G/A/T) TA(T/C) TAC AAG TTC CCT (T/C)CT (A/G)TG AC
Pas 2	Antisense	GTC A(A/G)A G(T/C)A GGG AAC TTG TA(T/C) TA(A/T/C) GG
PPO s	Sense	GAT TGG TTG AAC TCC GAA TTC TTT TTC TA
PPO as	Antisense	TAG AAA AAG AAT TCG GAG TTC AAC CAA TC

Tab. 8: Aufgeführt sind die als Primer für die RT-PCR und als Sonde benutzten Oligonucleotide. Alle Sequenzen sind in 5'-3' Richtung aufgeschrieben. Sense steht für die normale Leserichtung und antisense für den entsprechenden Primer in Gegensinnrichtung.

Die Primer wurden wie folgt kombiniert:

Ps 2 / PPO as und Pas 2 / PPO s

Als Annealing-Temperatur wurden 52°C und 56°C gewählt.

2.4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Ansätze

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 0,7% Agarose-Gel verwendet. Dazu wurde 0,7 g NEEO-Agarose eingewogen und mit 100 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und gut gemischt. In diesen Ansatz wurde noch 10 µl Ethidiumbromid (1% in Wasser gelöst) zugegeben. Für die Gelelektrophorese wurde als Laufmittelpuffer TBE-Puffer pH 7,5 genutzt.

Als Größenmarker wurde der Gene Ruler DNA Ladder Mix von MBI Fermentas eingesetzt.

2.4.3 Klonierung

2.4.3.1 Isolierung der PCR-Fragmente aus Agarosegel

Die Isolierung der PCR-Produkte aus Agarosegelen erfolgte gemäß der Anleitung für das Produkt NucleoTrap der Firma Clontech.

Die PCR-Fragmente wurden unter UV-Licht (254 nm) aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Zu ungefähr 100 mg Agarose wurden 300 µl des Puffer NT1 gegeben. Die NucleoTrap Suspension, in der das Adsorbens für die DNA ist, wurde gut gemischt und 10 µl davon in den Ansatz gegeben. Der gesamte Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 10 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Zwischendurch muß der Ansatz ungefähr alle zwei Minuten kurz gemischt werden.

Das Trägermaterial mit den daran gebundenen PCR-Fragmenten wird 30 Sekunden bei 10.000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. In den Ansatz wird nun 500 µl des Puffers NT2 zugegeben und vorsichtig gemischt. Nachdem das Adsorbens abzentrifugiert wurde, wird dieser Arbeitsschritt einmal wiederholt. Zum Sediment wird dann 500 µl des Puffers NT3 gegeben, gemischt und abzentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wird ebenfalls einmal wiederholt. Nachdem das Adsorbens mit der daran gebundenen DNA wieder abzentrifugiert wurde, wird der Ansatz für 10-15 Minuten an der Luft getrocknet.

Zum getrockneten Niederschlag wird dann 20-50 µl TE-Puffer pH 8 gegeben, gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wird der Ansatz gemischt um eine möglichst quantitative Lösung der DNA vom Trägermaterial zu erreichen. Der Überstand wird abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.4.3.2 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die aus dem Gel eluierten PCR-Fragmente wurden durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert und dann bei 0°C 13.000 g 20 Minuten sedimentiert.

Die sedimentierten PCR-Fragmente wurden in 5 µl TE-Puffer pH 8 resuspendiert.

Die Klonierung wurde gemäß der Produktbeschreibung des Perfectly Blunt Cloning Kits von Novagen durchgeführt, jedoch wurde der Gesamtansatz halbiert.

2.4.3.3 Modifizierung der Enden der PCR-Fragmente

2 µl	PCR-Fragment (in TE-Puffer pH 8)
0,5 µl	Nuclease-freies Wasser
2,5 µl	End Conversion Mix

Die gesamten Ansätze wurden vorsichtig mit der Pipette gemischt und anschließend für 15 Minuten bei 22°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden anschließend 5 Minuten auf 75°C erhitzt und daraufhin 2 Minuten auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert.

2.4.3.4 Ligation

Zu den Ansätzen wurden je 0,5 µl Blunt Vector (25 ng) und T4 DNA-Ligase (2 U) gegeben und mit der Pipette gemischt. Die Ligationsansätze wurden 15 Minuten bei 22°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

2.4.3.5 Transformation

Zur Transformation wurden die mitgelieferten kompetenten Bakterien, NovaBlue Singles™ Competent Cells, auf Eis aufgetaut und je 25 µl Bakteriensuspension vorsichtig mit 1 µl des Ligationsansatzes gemischt und 5 Minuten auf Eis gestellt. Daraufhin wurden die Transformationsansätze 30 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Zu jedem Ansatz wurden 125 µl SOC-Medium gegeben und dann 30 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler (200-250 UpM) inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf 2 LB-Agar-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.4.3.6 LB-Agar-Medium für Bakterien

Für die mitgelieferten kompetenten Zellen „NovaBlue“ wurde das LB-Nährmedium (siehe Tab. 9) folgendermaßen vorbereitet.

Trypton/Caseinhydrolysat	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
NaOH 10 N	0,5 ml/l
Agar-Agar	15 g/l

Tab. 9: Bestandteile des LB-Mediums für Bakterienkulturen

Das LB-Medium (150 ml) wurde in der Mikrowelle erhitzt auf circa 50°C abgekühlt und dann mit 375 µl Ampicillin (20 mg/ml) versetzt. Das Medium wurde in sterile Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erstarren des Mediums wurden je Platte 35 µl X-Gal (50 mg/ml) und

20 µl IPTG (100 mM) zugegeben und verteilt. Nach 30 Minuten wurden die Platten zum Beimpfen mit Bakteriensuspension verwendet.

2.4.3.7 Selektion positiver Kolonien

Die kompetenten Bakterienzellen verfügten über eine Blau-weiß Selektion. Bei einer Blau-weiß Selektion liegt die Klonierungsstelle innerhalb des lacZ –Gens, das für eine β-Galactosidase kodiert. Wenn durch eine erfolgreiche Transformation dieses Gen unterbrochen ist, kann dieses Enzym nicht mehr von den Bakterien gebildet werden. Diese bleiben nach Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß, während sich die anderen Kolonien blau färben (Mülhardt, 2002). Die weißen Kolonien wurden mit einem Zahnstocher in 4 ml frisches LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin überführt und 12 Stunden auf einem Schüttler mit 250 UpM bei 37°C inkubiert.

2.4.3.8 Plasmidreinigung

Die Reinigung der Plasmide aus den Bakterienzellen erfolgte nach der Anweisung zum Plasmid Mini Purification System der Firma Qiagen.

Es wurden 3 ml der Bakteriensuspension abzentrifugiert und die Sedimente in 0,3 ml Puffer P1 vollständig resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde 0,3 ml Puffer P2 gegeben, vorsichtig gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischendurch wurde die Suspension mehrmals vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 0,3 ml gekühlter Puffer P3 zugegeben und sofort vorsichtig gemischt und weiter fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden 10 Minuten bei 13.000 upm abzentrifugiert und der Überstand auf die mit 1 ml QBT-Puffer voräquilibrierten Säulen gegeben. Die Säulen wurden mit 4 ml QC-Puffer gewaschen und die daran gebundene DNA mit 0,8 ml QF-Puffer eluiert.

Die Plasmide wurden 16 Stunden mit 0,56 ml Isopropanol präzipitiert und 30 Minuten bei 13.000 UpM sedimentiert. Die sedimentierten Plasmide wurden mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und fünf Minuten an der Luft getrocknet. Die Plasmide wurden in 20 µl sterilem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde zum Restriktionsverdau verwendet.

2.4.3.9 Restriktionsverdau der Plasmide mit *Eco* RI

Die Plasmide wurden mit dem Restriktionsenzym *Eco* RI von Boehringer Mannheim geschnitten. Dafür wurden 4 µl der resuspendierten Plasmid-DNA mit 0,5 µl 10*Puffer und 0,5 µl des Restriktionsenzym *Eco* RI gemischt.

Der gesamte Ansatz wurde einige Stunden lang inkubiert. Der gesamte Versuchsansatz wurde dann auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und analysiert.

2.5 Chemikalien und Geräte

2.5.1 Chemikalien

4-Hydroxybenzoesäure	Merck-Schuchardt, München
4-Hydroxyphenyllactat	Sigma Aldrich, Steinheim
4-Hydroxyphenylpyruvat	Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Anti Dig-Fab Fragmente	Roche
Ascorbinsäure	Fluka, Buchs (Schweiz)
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Butanol	Roth, Karlsruhe
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chlorogensäure	Fluka, Buchs (Schweiz)
Coomasie Brilliant Blue G250	Fluka, Buchs (Schweiz)
Coomasie Brilliant Blue R250	Fluka, Buchs (Schweiz)
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Di-Na-3-(4-methoxy Spiro(1,2-dioxyethan-3,2-(5-chloro)-tricyclo[3.3.1.1 3,7]decan)-4-yl)phenyl-phosphat (CSPD)	Roche
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
Essigsäure	Riedel-de Häen, Seelze
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ethylacetat	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat-2Na-H ₂ O (EDTA)	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Duchefa
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaffeensäure	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat	Fluka, Buchs (Schweiz)
L-Dihydroxyphenylalanin (DOPA)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Lithiumchlorid	Duchefa
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Duchefa
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

Methanol	Riedel-de Häen, Seelze
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
N,N-Methylenbisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat	Roth, Karlsruhe
Natrium-Ascorbat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdiethyldithiocarbaminat (DIECA)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol, Hamburg
Natriumnitrit	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Baker
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
o-Phosphorsäure	Fluka, Buchs (Schweiz)
p-Cumarsäure	Merck
p-Cumarylchinasäure	D.Werck-Reichhard
p-Cumaryldihydroxyphenyllactat	Isoliert von Prof. Petersen
Phenol Citrat-Puffer gesättigt	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Polyclar 10	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Röntgenfilm (Lumifilm)	Roche
Saccharose	Nordzucker
Salzsäure	Riedel-de Häen, Seelze
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
β -D-Galactopyranosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
β -Glucosidase	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Tropolon	Fluka, Buchs (Schweiz)
Tyrosin	Merck, Darmstadt

2.5.2 Geräte:

Gefriertrockner Christ L-1	B. Braun Biotech International Melsungen
Drehschieber-Vakuumpumpe RZ 2	Vacuubrand, Wertheim
HPLC	
Kontron HPLC Pump 422	Kontron Instruments, Neufahrn
Mixer M 490	Kontron Instruments, Neufahrn
Detektor 430 A	Kontron Instruments, Neufahrn
L-6000 Pump	Merck-Hitachi, Darmstadt
Spectro Monitor 3200	LDC Analytical

Chromato-Integrator D 2500	Merck-Hitachi, Darmstadt
Leitfähigkeitselektrode	
ATC Conductivity Meter Commet 1	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
pH-Meter	
Accumet Basic	Fisher Scientific, Wohlen Schweiz
Photometer	
Kontron Uvikon Spektrometer 930	Konton Instruments, Eching
Refraktometer HR 18	A. Krüss Optotronic GmbH, Hamburg
Ultraschallbad	
Sonorex Super RK 255	Bandelin, Berlin
Waagen	
Feinwaage	August Sauter KG, Ebingen
Digitalwaage PT 310	Sartorius, Göttingen
Digitalwaage EG-300-3M	Kern, Albstadt
Wasserbad	
Julabo SW 20	Julabo, Seelbach
Julabo 5A	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	
Biofuge 17 RS	Heraeus Sepatech, Düsseldorf
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sigma 3 K 30	B. Braun Biotech International, Melsungen
Sorvall RC 50 Plus	Sorvall, Bad Homburg v.d.H.

3. Ergebnisse

3. 1 Inhaltsstoffanalytik der Tomatenzellkulturen

3.1.1 Säurehydrolyse der Hydroxyzimtsäureester

Bei beiden Tomatenzelllinien wurden die Inhaltsstoffspektren vorwiegend auf Phenylpropan-derivate untersucht. Die methanolischen Tomatenzellextrakte wurden direkt analysiert, und mit einem Aliquot der jeweiligen Extrakte wurde eine saure Hydrolyse durchgeführt.

In den methanolischen Zellextrakten wurden die Gehalte von p-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure bestimmt. In der Abbildung 5 sind die Inhaltsstoffspektren des unbehandelten und des behandelten Extrakts der transgenen Kultur dargestellt. Es liegt vor der sauren Hydrolyse hauptsächlich Chlorogensäure (520 nmol bezogen auf 1 g Zelltrockengewicht) im Extrakt vor. Des weiteren konnten größere Mengen p-Cumarsäure (117 nmol/g TG) und Ferulasäure (60 nmol/g TG) gemessen werden. Kaffeesäure liegt mit 6 nmol/g Trockengewicht in eher geringen Mengen im methanolischen Extrakt vor.

Nach der 15-minütigen sauren Hydrolyse ist erwartungsgemäß keine Chlorogensäure mehr im Extrakt nachweisbar, dafür ist der Gehalt an Kaffeesäure stark angestiegen auf 440 nmol/g Trockengewicht. Des weiteren hat auch der Gehalt an Ferulasäure im Extrakt deutlich zugenommen.

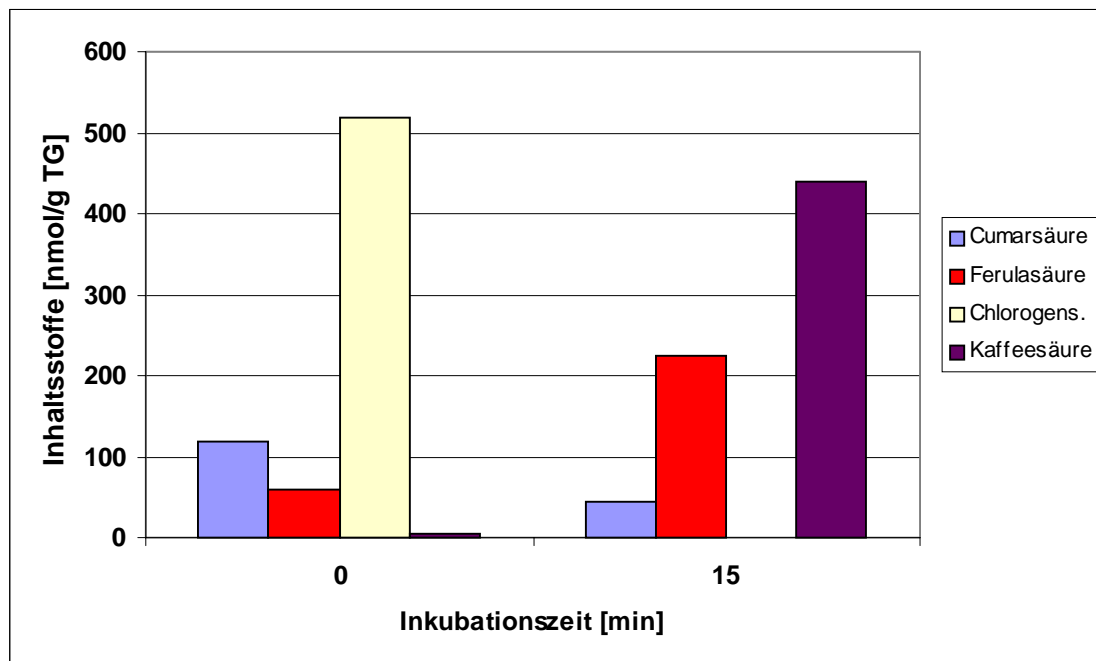


Abb. 5: Inhaltsstoffspektrum der methanolischen Extrakte aus der transgenen Tomatenzellkultur vom siebten Kulturtag vor und nach einer 15-minütigen sauren Hydrolyse. Gehalte in nmol/g Trockengewicht (TG).

Im methanolischen Zellextrakt der nicht-transgenen Kultur (Abb. 6) liegt vor der Esterhydrolyse vor allem Chlorogensäure (278 nmol/g TG) vor, allerdings in deutlich geringeren Mengen als im Extrakt aus der transgenen Kultur. Ebenfalls sind in der nicht-transgenen Kultur (Abb. 6) größere Mengen Ferulasäure (104 nmol/g Trockengewicht) nachweisbar. Im Extrakt sind weder p-Cumarsäure noch Kaffeesäure zu finden.

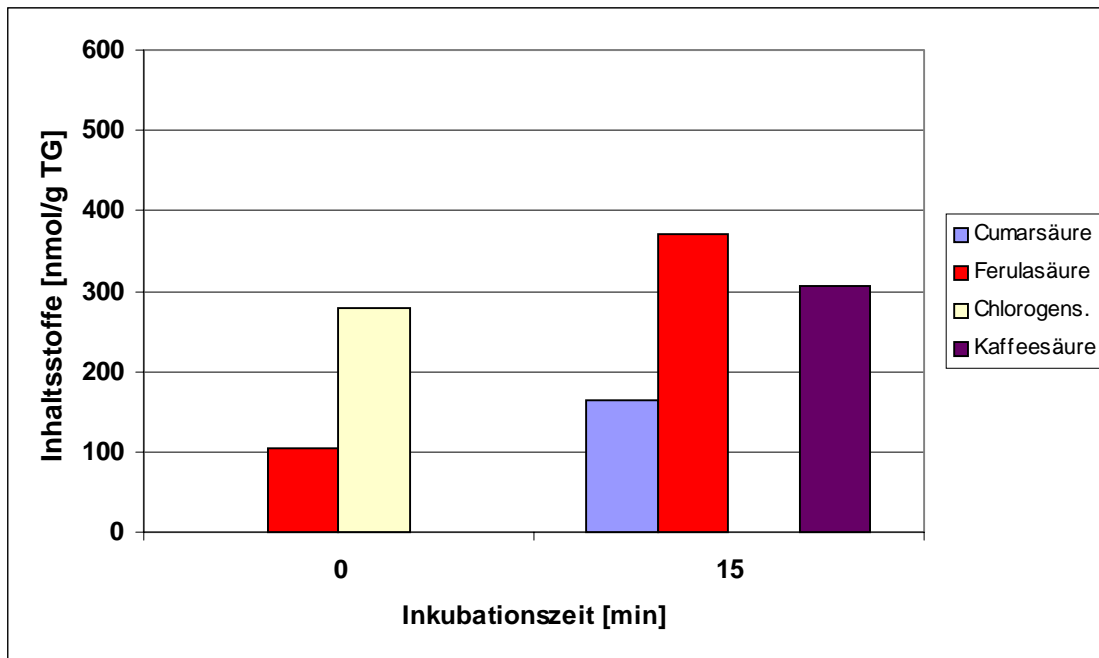


Abb. 6: Inhaltsstoffspektrum der methanolischen Extrakte aus der nicht-transgenen Tomatenzellkultur vom siebten Kulturtag vor und nach einer 15-minütigen sauren Hydrolyse. Gehalte in nmol/g Trockengewicht (TG).

Nachdem mit dem Extrakt eine saure Hydrolyse durchgeführt wurde, liegt auch hier keine Chlorogensäure mehr vor. Kaffeesäure ist nach der Esterhydrolyse mit 308 nmol/g Trockengewicht in größeren Mengen zu detektieren, ebenso wie nun auch p-Cumarsäure mit 107 nmol/g TG nachzuweisen ist. Die Menge an Ferulasäure hat ebenfalls stark zugenommen und liegt nun bei 370 nmol/g Trockengewicht.

3.1.2 Enzymatische Glucoseabspaltung

In der Abb. 7 sind die phenolischen Inhaltsstoffe der nicht-transgenen Kultur vor und nach einer enzymatischen Glucoseabspaltung durch β -Glucosidase aus Mandeln dargestellt. Es ist zu erkennen, dass größere Mengen Ferulasäure glucosidiert vorliegen. Nach einer zweistündigen enzymatischen β -Glucosidasebehandlung können fast 340 nmol/g Trockengewicht (TG) Ferulasäure bestimmt werden, während vor der enzymatischen Glucoseabspaltung nur 24 nmol/g Trockengewicht Ferulasäure im methanolischen Extrakt vorliegen. Chlorogensäure liegt nicht als Glucosid in der Tomatenzelllinie vor. p-Cumarsäure liegt im unbehandelten Extrakt nicht vor, während nach einer Behandlung mit β -Glucosidase aus Mandeln 71 nmol/g TG bestimmt wurden.

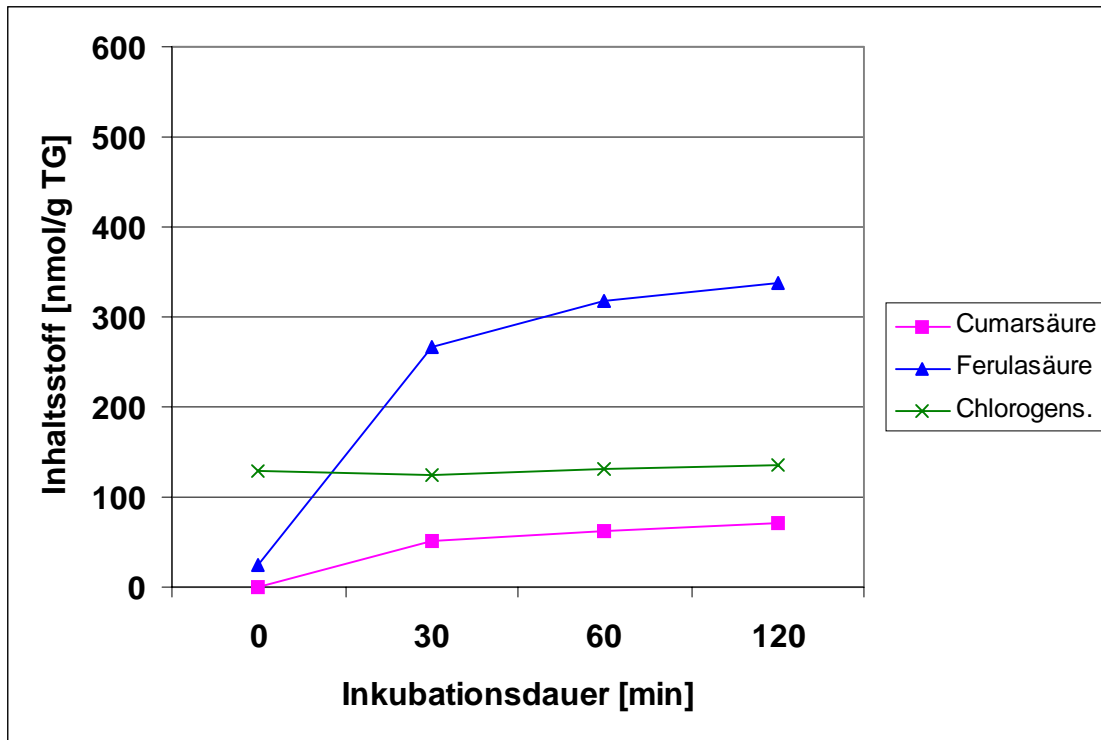


Abb. 7: Inhaltsstoffanalyse der methanolischen Extrakte der nicht-transgenen Tomatenzelllinie vor und nach einer Glucoseabspaltung durch β -Glucosidase aus Mandeln. Gehalte in nmol/g Trockengewicht (TG).

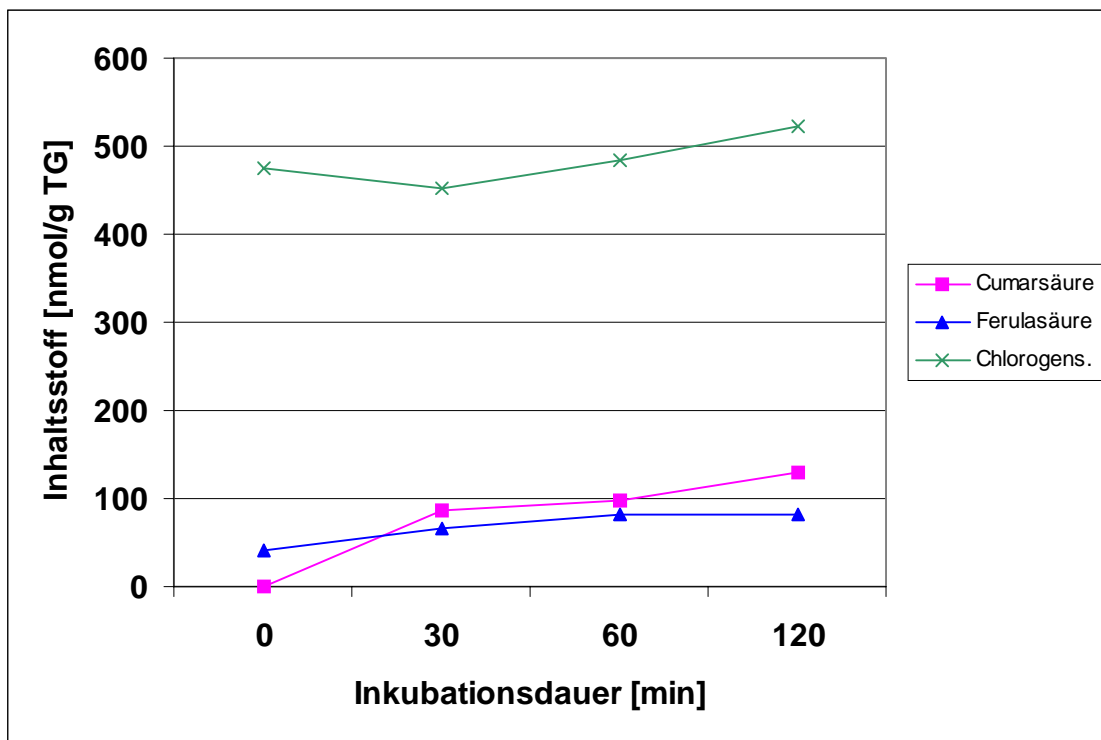


Abb. 8: Inhaltsstoffanalyse der methanolischen Extrakte der transgenen Tomatenzelllinie vor und nach einer Glucoseabspaltung durch β -Glucosidase aus Mandeln. Gehalte in nmol/g Trockengewicht (TG).

In den methanolischen Extrakten der transgenen Tomatenzelllinie (Abb. 8) hingegen fällt zunächst der deutlich höhere Anteil an Chlorogensäure auf. Es ist aber auch wieder zu sehen, dass die Chlorogensäure nicht als Glucosid vorliegt. Dagegen liegt p-Cumarsäure, wie auch bei der anderen Kultur, glucosidiert im Extrakt vor. Nach einer zweistündigen Glucosidase-Behandlung wurden 129 nmol/g TG p-Cumarsäure im Extrakt bestimmt. Dies liegt deutlich über den ermittelten Werten für die nicht-transgene Kultur. Im Gegensatz dazu liegen die Werte für Ferulasäure in der transgenen Kultur unter denen der nicht-transgenen Kultur. Ferulasäure liegt auch glucosidiert vor. Nach zwei Stunden findet man 82 nmol Ferulasäure /g TG.

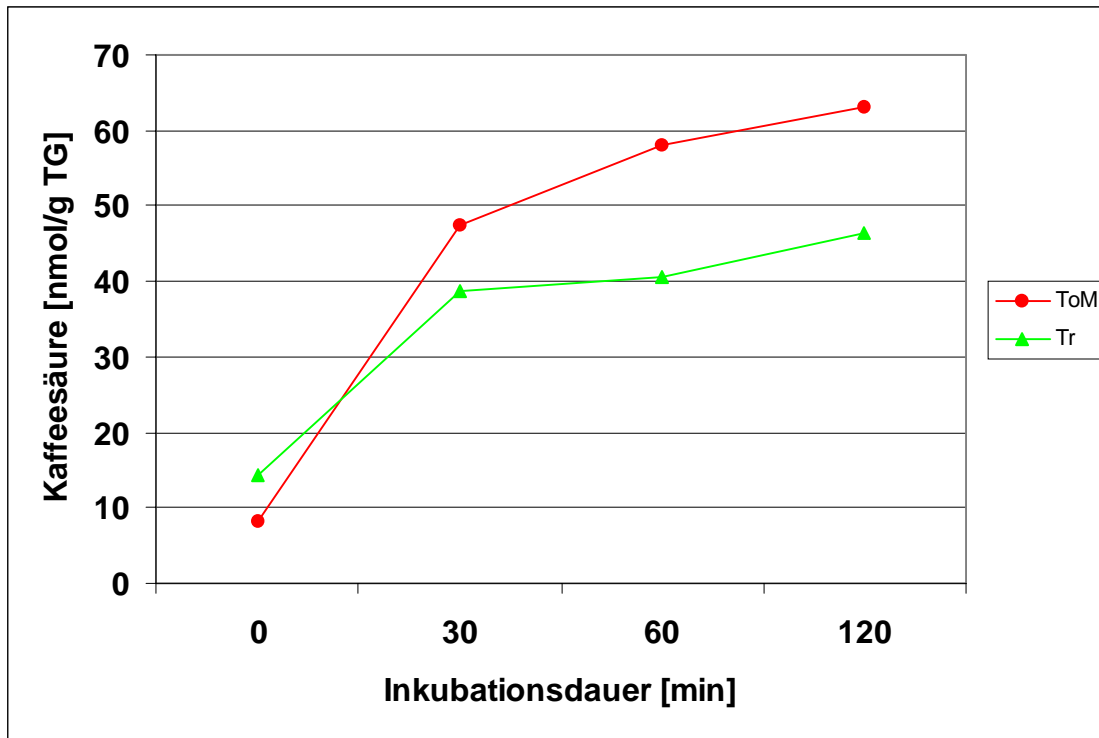


Abb. 9: Vergleich des Kaffeensäuregehalts der methanolischen Extrakte der transgenen Kultur (Tr) und der nicht-transgenen Kultur (ToM) vor und nach einer Glucoseabspaltung durch β -Glucosidase aus Mandeln. Gehalte in nmol/g Trockengewicht (TG).

Kaffeensäure (Abb. 9) liegt in beiden Kulturen in vergleichbaren Mengen vor, und ebenfalls liegt in beiden Kulturen ein großer Teil der Kaffeensäure glucosidiert vor. In der nicht-transgenen Kultur lässt sich nach zwei Stunden 74 nmol/g TG bestimmen und im Extrakt der transgenen Kultur 46 nmol/g TG. In der nicht-transgenen Kultur liegt also ein deutlich größerer Anteil der Kaffeensäure als Glucosid vor, als in der transgenen Kultur.

3.2 Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen

3.2.1 Wachstum der beiden Tomatenzellkulturen

Die beiden Tomatenzelllinien zeigen hinsichtlich ihrer untersuchten Wachstumsparameter eine ähnliche Entwicklung. Bei beiden Kulturen findet bis zum fünften / sechsten Tag der Kulturperiode (Abb. 10/11) eine Zunahme des Trockengewichts statt, bei der nicht-transgenen Kultur auf 0,54 g pro Kolben und 0,62 g pro Kolben bei der transgenen Kultur. Daraufhin stagniert das Trockengewicht bei der nicht-transgenen Kultur am siebten Kulturtag und sinkt anschließend. Bei der transgenen Kultur findet ab dem fünften Tag eine Abnahme des Trockengewichts statt.

Die Kurven für das Frischgewicht der beiden Kulturen steigen bis zum siebten Tag der Kulturperiode an. Bei der nicht-transgenen Kultur steigt das Frischgewicht pro Kolben auf 16,1 g (Abb. 10) und bei der transgenen Kultur auf 15,8 g an (Abb. 11). Ab dem siebten Kulturtag sinkt das Frischgewicht bei beiden Kulturen wieder.

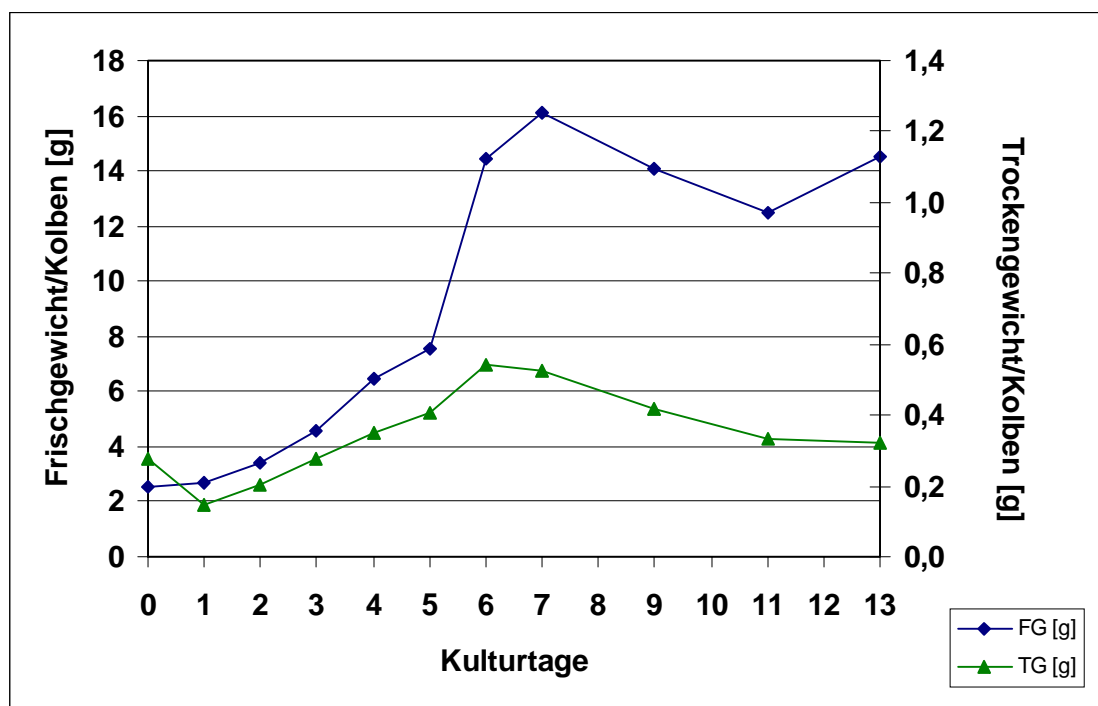


Abb. 10: Entwicklung des Frisch- und Trockengewichts der nicht-transgenen Tomatenzell-suspensionskultur über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

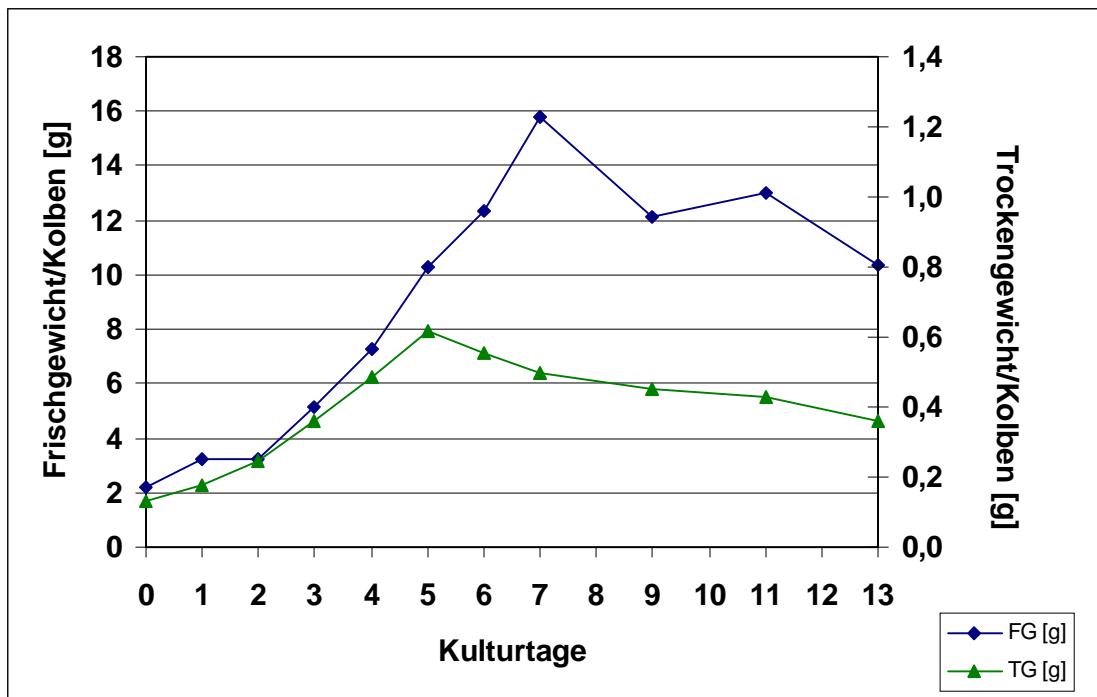


Abb. 11: Entwicklung des Frisch- und Trockengewichts der transgenen Tomatenzellsuspensionskultur über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

3.2.2 Veränderung der Kulturmedien

Der pH-Wert (Abb. 12) im Medium der beiden Kulturen ändert sich während der Kulturperiode nicht signifikant. Er schwankt bei beiden Kulturen leicht und steigt im Kulturverlauf bei der nicht-transgenen Tomatenkultur von pH 5,6 auf einen pH-Wert von 7, und bei der transgenen Kultur von 5,8 auf 7,7.

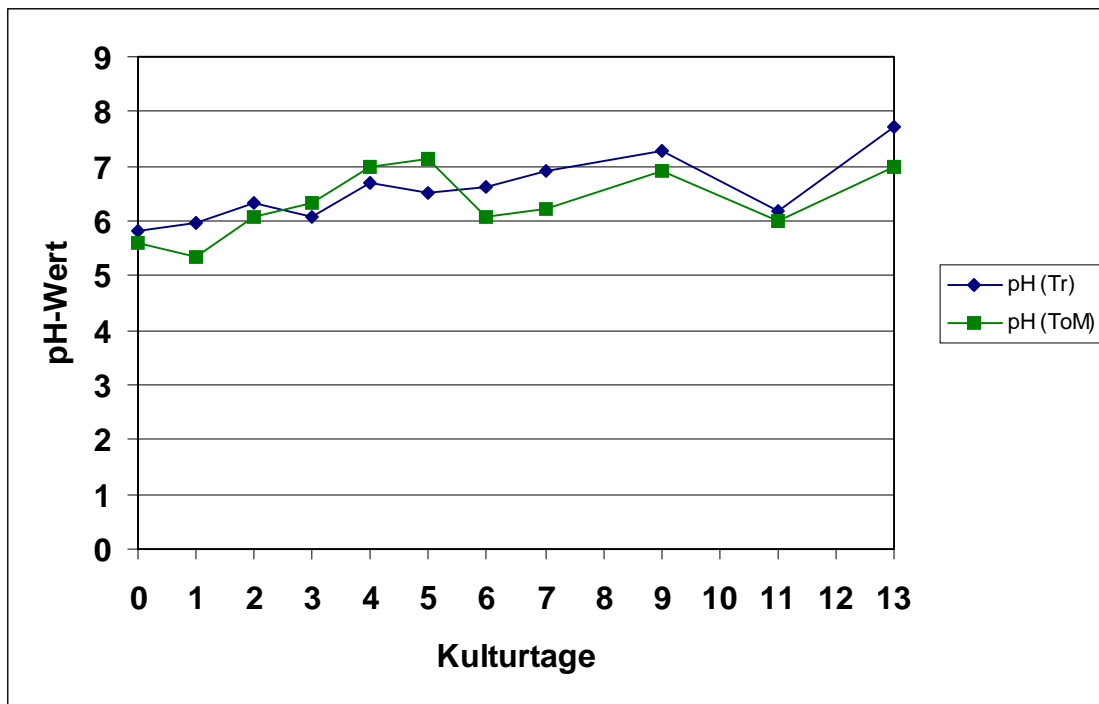


Abb. 12: Entwicklung des pH-Werts im Medium der beiden Tomatenzellkulturen (Tr = transgen / ToM = nicht-transgen) über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

Der über den Brechungsindex ermittelte Zuckergehalt des flüssigen Nährmediums verändert sich während der Kulturperiode deutlich (Abb. 13). Bei der transgenen Kultur sinkt er von 2% zu Beginn der Kulturperiode auf 0,3% am fünften Tag. Danach sinkt er noch leicht auf 0,1% und steigt zum Ende der untersuchten Kulturperiode wieder auf 0,2% an. Im Medium der nicht-transgenen Tomatenkultur sinkt der Zuckergehalt vom zweiten Tag der Kulturperiode bis zum sechsten Tag von 2% auf 0,2%. Danach steigt er ebenfalls bis zum Ende der Kulturperiode auf 0,3% an.

Die Entwicklung der Leitfähigkeit des Mediums (Abb. 14) verläuft bei beiden Kulturen sehr ähnlich. Die Leitfähigkeit sinkt vom Beginn der Kulturperiode bis zum siebten Tag und steigt dann bei beiden Kulturen ab dem neunten Tag wieder an.

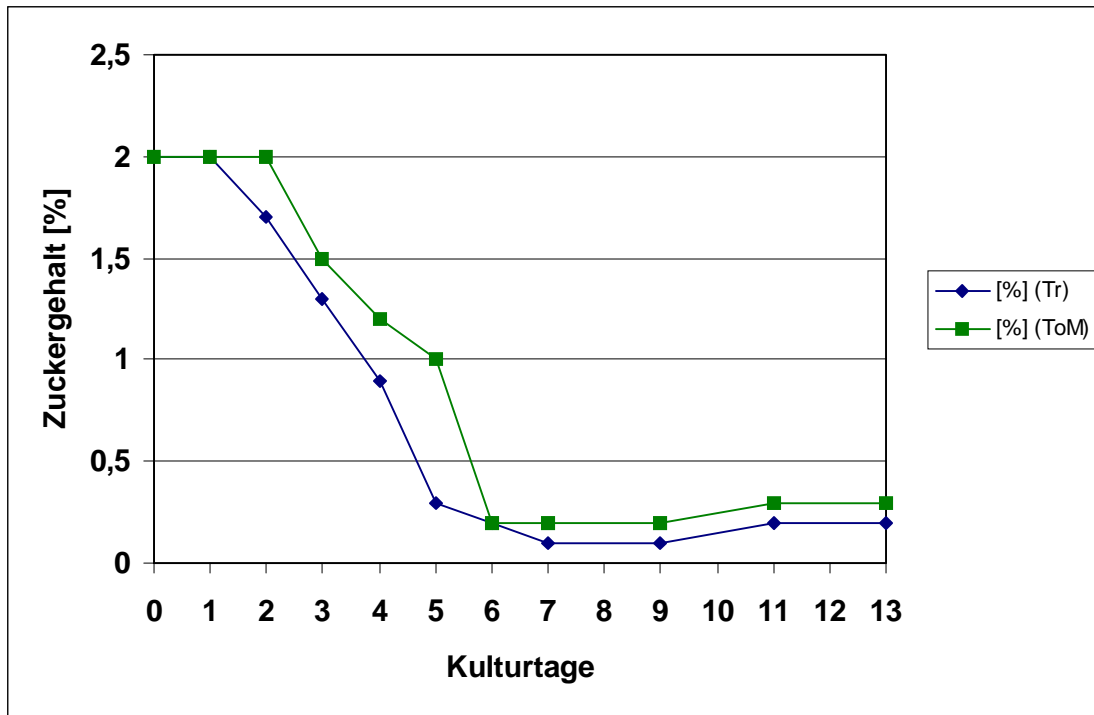


Abb. 13: Entwicklung des Zuckergehalts des Mediums der beiden Tomatenzellkulturen (Tr = transgen / ToM = nicht-transgen) über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

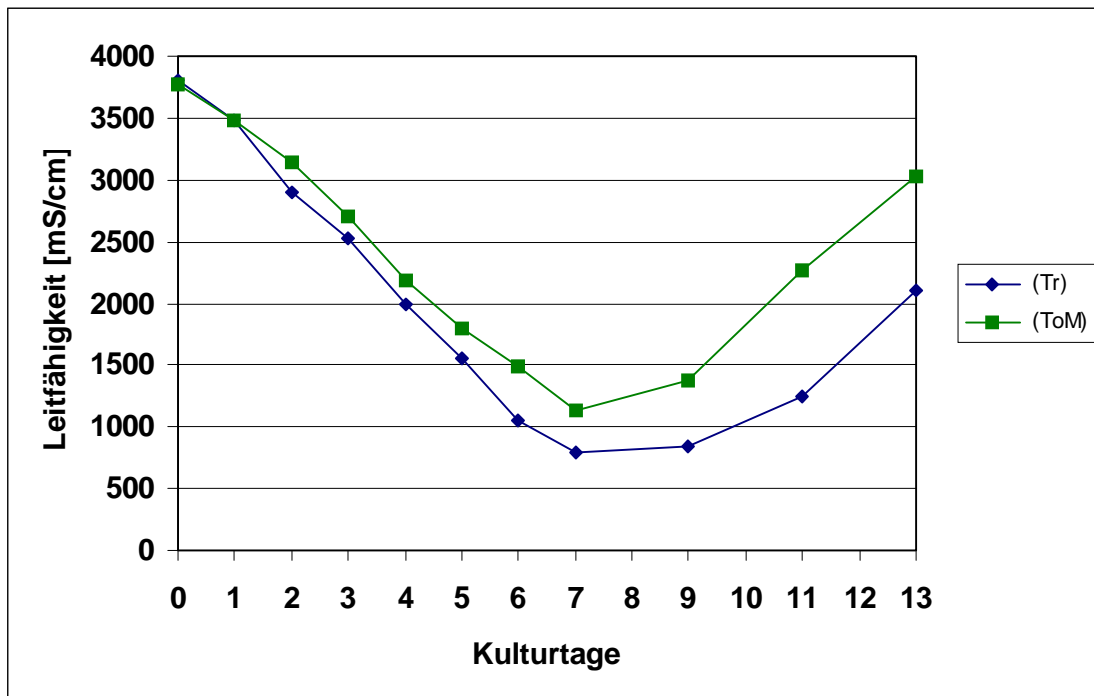


Abb. 14: Entwicklung der Leitfähigkeit im Medium der beiden Tomatenzellkulturen (Tr = transgen / ToM = nicht-transgen) über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

3.2.3 Bestimmung der Monophenolaseaktivitäten im Kulturverlauf

Im Rahmen der Charakterisierung wurden auch die Monophenolaseaktivitäten im gefällten Protein der beiden Tomatenzellkulturen bei den pH-Werten 4,5 und 7,5 bestimmt. Diese pH-Werte hatten sich in vorhergehenden Enzymtests als optimal erwiesen.

Die Enzymaktivitäten im Extrakt der transgenen Kultur (Abb. 15) liegen unter denen aus der Kontrollkultur (Abb.16). In der transgenen Kultur sind über die gesamte Kulturperiode nur sehr geringe Monophenolaseaktivitäten bei einem pH-Wert von 7,5 zu beobachten, während die enzymatische Aktivität bei einem pH Wert von 4,5 vom ersten Tag der Kulturperiode langsam bis zum vierten Tag auf bis zu 80 pkat ansteigt und danach bis zum siebten Tag wieder auf 31 pkat sinkt. Vom siebten Tag bis zum neunten Tag ist eine Zunahme der Monophenolaseaktivität auf 66 pkat zu verzeichnen und danach wieder eine Abnahme bis zum Ende der Messperiode.

Bei der nicht-transgenen Kontrollkultur (Abb. 16) ist im gefällten Protein von Beginn der Kulturperiode an ein starker Anstieg der Monophenolaseaktivität bei einem pH Wert von 4,5 zu beobachten. Bereits am ersten Kulturtag beträgt die enzymatische Aktivität 97 pkat. Die Enzymaktivität steigt noch leicht bis zum fünften Tag der Kulturperiode auf 125 pkat an, und sinkt dann bis zum sechsten Tag auf 30 pkat. Die Enzymaktivität bei pH 4,5 steigt dann vom sechsten Tag bis zum neunten Tag auf 63 pkat an.

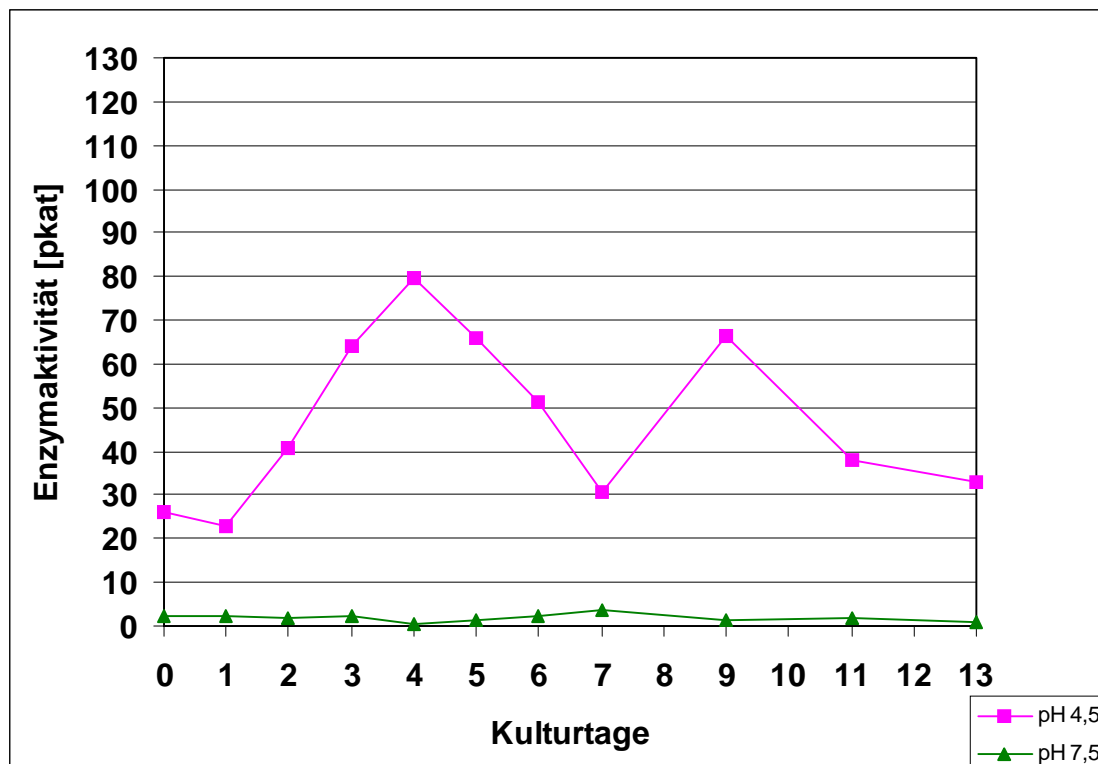


Abb. 15: Monophenolaseaktivität der PPOs aus der transgenen Tomatenzellkultur bei den pH-Werten 4,5 und 7,5 über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

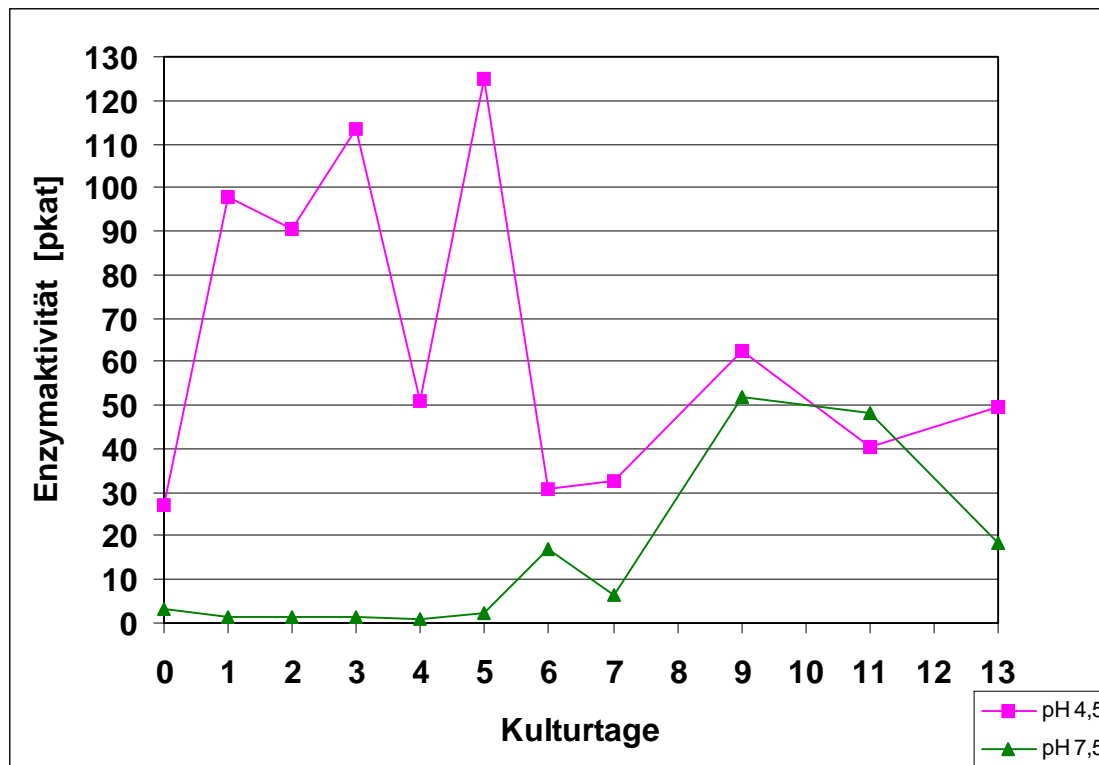


Abb. 16: Monophenolaseaktivität bei den pH-Werten 4,5 und 7,5 der PPOs aus der nicht-transgenen Tomatenzellkultur über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

Die Monophenolaseaktivität bei pH 7,5 im gefällten Protein der Kontrollkultur ist zu Beginn der Kulturperiode sehr niedrig bei 3 pkat und steigt erst ab dem fünften Tag der Kulturperiode stark an auf über 52 pkat am neunten Tag der Kulturperiode und 48 pkat am elften Tag und sinkt von da an auf 18 pkat am dreizehnten Tag (Abb. 16).

Die spezifische Monophenolaseaktivität im gefällten Protein der transgenen Tomatenkultur (Abb. 17) ist ebenfalls niedriger als in der nicht-transgenen Kontrollkultur (Abb. 18). Bei einem pH-Wert von 4,5 im Enzymtest sinkt die spezifische Aktivität von 1022 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ zu Beginn der Kulturperiode auf 365 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ am ersten Tag. Von da an steigt die spezifische Monophenolaseaktivität bis zum fünften Tag auf 1878 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ an. Am sechsten und siebten Tag des Untersuchungszeitraums sinkt die spezifische Enzymaktivität bei pH 4,5 wieder auf 690 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ und steigt dann bis zum Ende der untersuchten Kulturperiode wieder auf 1534 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ an. Die spezifische Monophenolaseaktivität bei einem pH-Wert von 7,5 im gefällten Protein der transgenen Kultur schwankt während der gesamten Kulturperiode zwischen 10 und 100 $\mu\text{kat}/\text{kg}$.

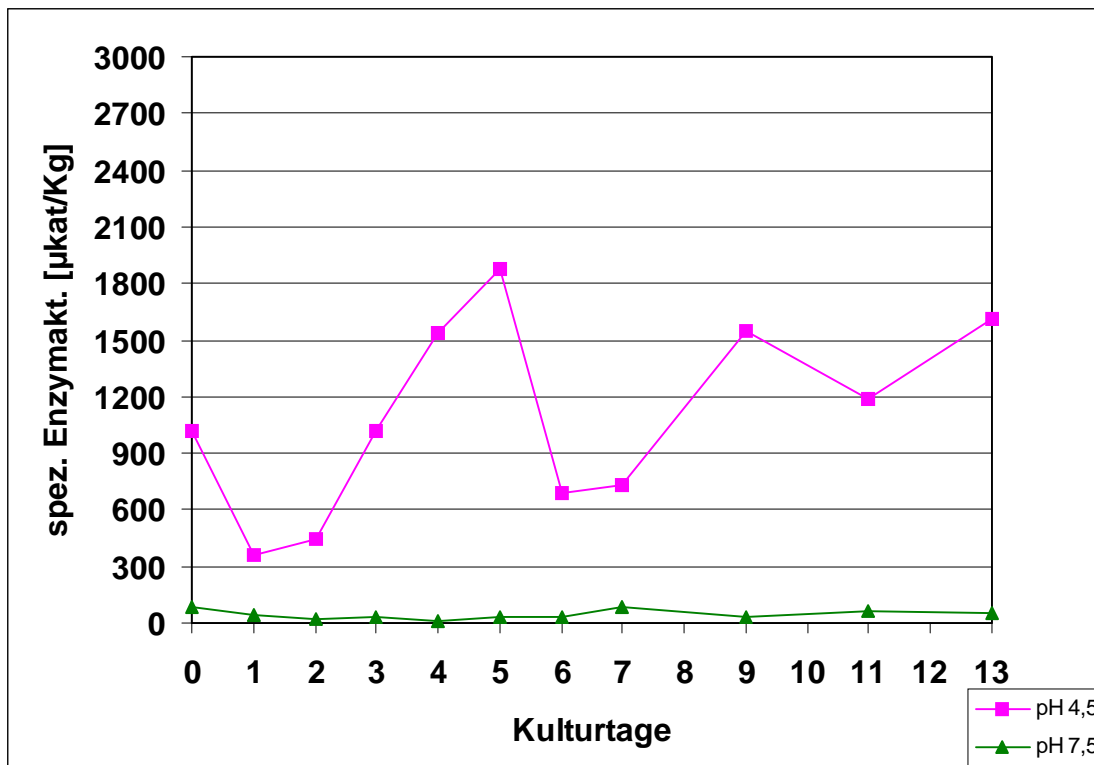


Abb. 17: Spezifische Monophenolaseaktivität der PPOs aus der transgenen Kultur bei den pH Werten 4,5 und 7,5 über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

Die spezifische Monophenolaseaktivität der PPOs aus der nicht-transgenen Tomatenkultur bei einem pH Wert von 4,5 (Abb. 18) steigt zum ersten Tag der Kulturperiode auf 1040 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ und erreicht am fünften Tag ein Maximum bei 1363 $\mu\text{kat}/\text{kg}$. Am sechsten und siebten Tag der Kulturperiode liegt die spezifische Enzymaktivität unter 500 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ und steigt dann zum Ende der Kulturperiode auf 2581 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ am dreizehnten Tag an. Die spezifische Monophenolaseaktivität bei einem pH-Wert von 7,5 im gefällten Protein dieser Kultur steigt erst am sechsten Tag der Kulturperiode signifikant auf 227 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ an, und erreicht am elften Tag ihr Maximum mit 1670 $\mu\text{kat}/\text{kg}$.

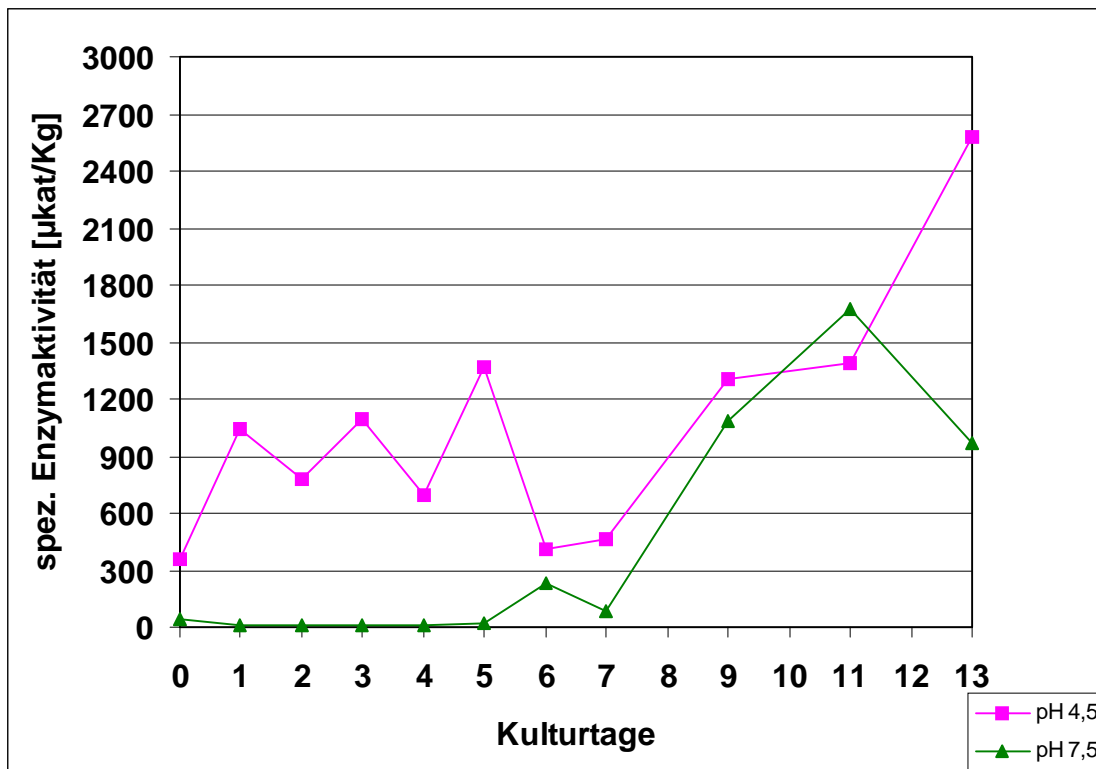


Abb. 18: Spezifische Monophenolaseaktivität der PPOs aus der nicht-transgenen Kultur bei den pH Werten 4,5 und 7,5 über eine Kulturperiode von 13 Tagen.

3.3 Mikrosomale p-Cumarsäure 3-Hydroxylasen

In den Mikrosomensuspensionen die aus beiden Tomatenzelllinien hergestellt wurden, konnten keine eindeutigen Hinweise für eine enzymatische Umsetzung der p-Cumarsäure zur Kaffeesäure durch ein membranständiges Enzym nachgewiesen werden.

In Abb. 19 ist die Zunahme des Produkts Kaffeesäure über 4 Stunden dargestellt. Es wurde Mikrosomenextrakt der nicht-transgenen Tomatenzelllinie eingesetzt, in einer Konzentration von 0,5 mg/ml. In drei Kontrollproben wurde keine p-Cumarsäure zugegeben.

Es ist zu beobachten, dass in den Proben die keine p-Cumarsäure enthält trotzdem nach einer Stunde mehr Kaffeesäure vorliegt. Die Menge an Kaffeesäure steigt nicht weiter an. In den Tests mit dem Substrat p-Cumarsäure verdoppelt sich die Menge an Kaffeesäure im Test nach 30 Minuten. Danach flacht die Zunahme deutlich ab und steigt ab einer Inkubationsdauer von 2 Stunden nicht mehr signifikant an.

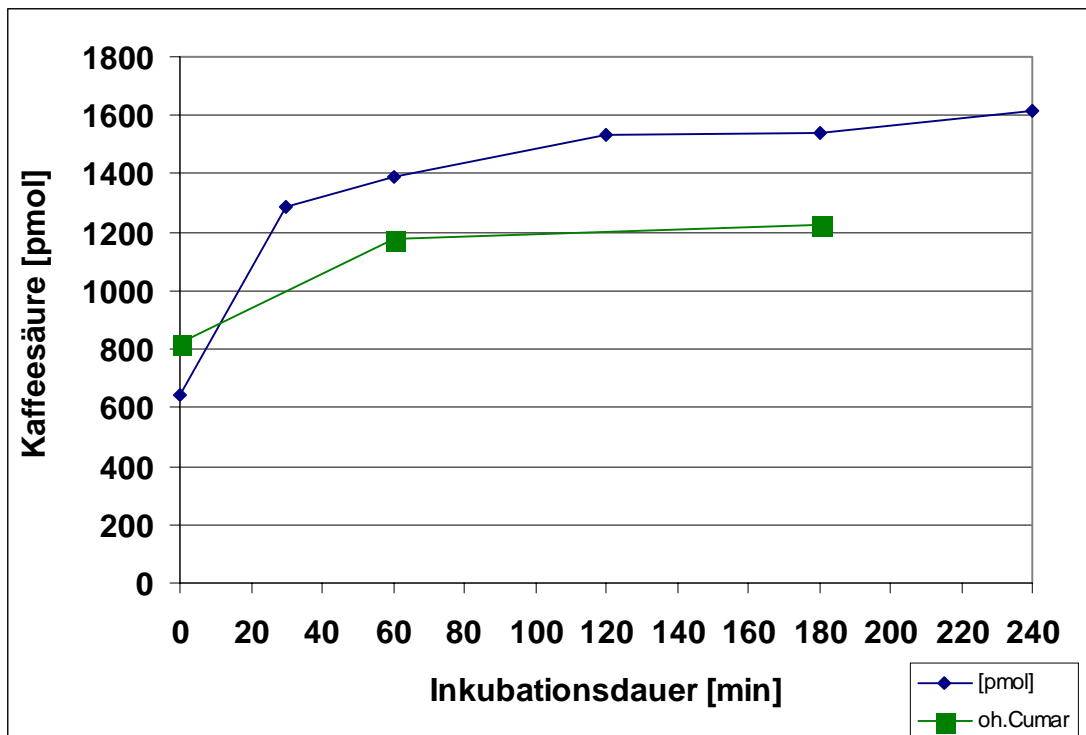


Abb. 19: Kaffeensäurebildung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [pmol]. Es wurde Mikrosomensuspension der nicht-transgenen Tomatenkultur verwendet. Es wurden drei Proben ohne Substrat inkubiert (oh. Cumar).

Die Differenz zwischen den Kaffeensäuremengen beider Versuchsreihen liegt nach 3 Stunden bei 300 pmol.

Es wurde für die Mikrosomen aus beiden Zelllinien überprüft ob zusätzliches DTT oder DIECA (Abb. 20) im Reaktionsansatz förderlich ist. Ebenso wurde NADPH, ein Protonenlieferant für Cytochrom-P450 abhängige Enzyme, dem Enzymtestansatz nicht zugefügt. Die Ergebnisse aus Abb. 20 zeigen die spezifische Enzymaktivität nach einer 60-minütigen Inkubation bei einer Mikrosomenkonzentration von 0,25 mg/ml.

Die Ergebnisse deuten nicht daraufhin das es eine enzymatische Aktivität einer 3'-Hydroxylase als Cytochrom-P450 abhängiges Enzym gibt. Denn die anhand der Kaffeensäureakkumulation ermittelten spezifischen Aktivitäten sind in den Proben ohne den Protonendonator NADPH und der Standardprobe gleich hoch.

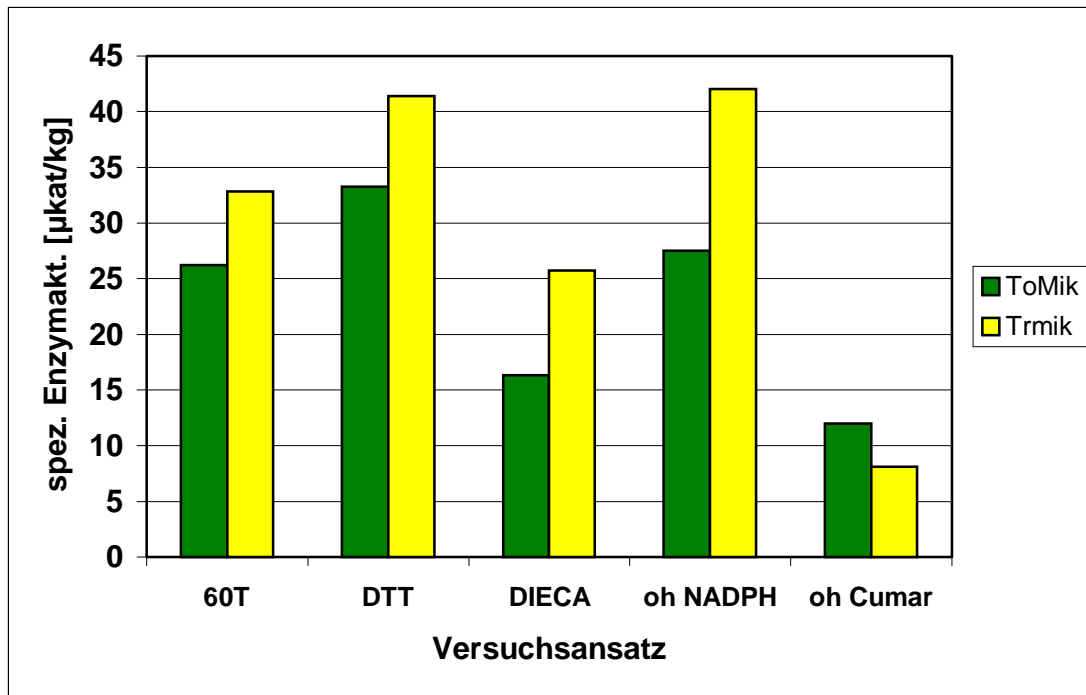


Abb. 20: Die spezifischen Enzymaktivitäten der Mirosomensuspension aus der transgenen Tomatenzelllinie (Trmik) und der nicht-transgenen Zelllinie (ToMik). 0T entspricht dem Nullwert, 60T = Referenz, DTT = 2 mM DTT im Ansatz, DIECA= 5 mM DIECA im Ansatz, oh. NADPH = kein NADPH im Ansatz, oh. Cumar = keine p-Cumarsäure im Ansatz

3.4 Bestimmung der Enzymparameter der Monophenolasereaktion

3.4.1 Bestimmung des pH-Optimums der Monophenolaseaktivität

Bei der Bestimmung des optimalen pH-Werts für die Monophenolasereaktion wurden zwei pH-Bereiche ermittelt. In Abb. 21 sind die Ergebnisse dargestellt, die mit 0,1 M Na-Acetat-Puffer ermittelt wurden. Es zeigt sich, dass ein optimaler pH-Wert für die Enzymreaktion bei pH 4,5 liegt. Dies trifft sowohl auf die PPOs der nicht-transgenen Kultur (ToM), als auch der transgenen Kultur (Tr) zu.

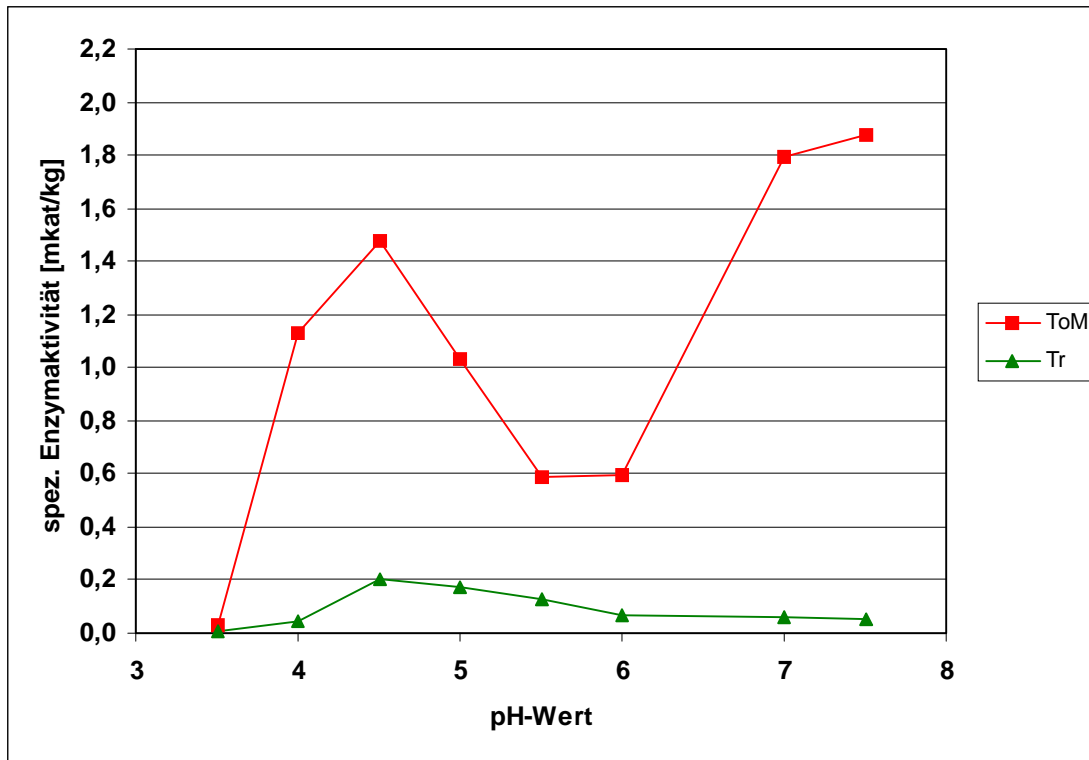


Abb. 21: Spezifische Enzymaktivitäten der PPO der beiden Tomatenkulturen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Als Puffer wurde 0,1 M Na-Acetat verwendet (ToM = Proteinextrakt aus der nicht-transgenen Kultur / Tr = Proteinextrakt aus der transgenen Kultur).

In der Abb. 22 sind die Ergebnisse dargestellt, die mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer ermittelt wurden. Bei den PPOs der nicht-transgenen Kultur (ToM) ist hier ein zweites pH-Optimum bei einem pH-Wert von 7,5 für die enzymatische Umsetzung der p-Cumarsäure in Kaffeesäure zu erkennen.

Beim Protein aus der transgenen Kultur ist bei diesen neutralen bis alkalischen pH-Werten keine gesteigerte Enzymaktivität mehr zu messen.

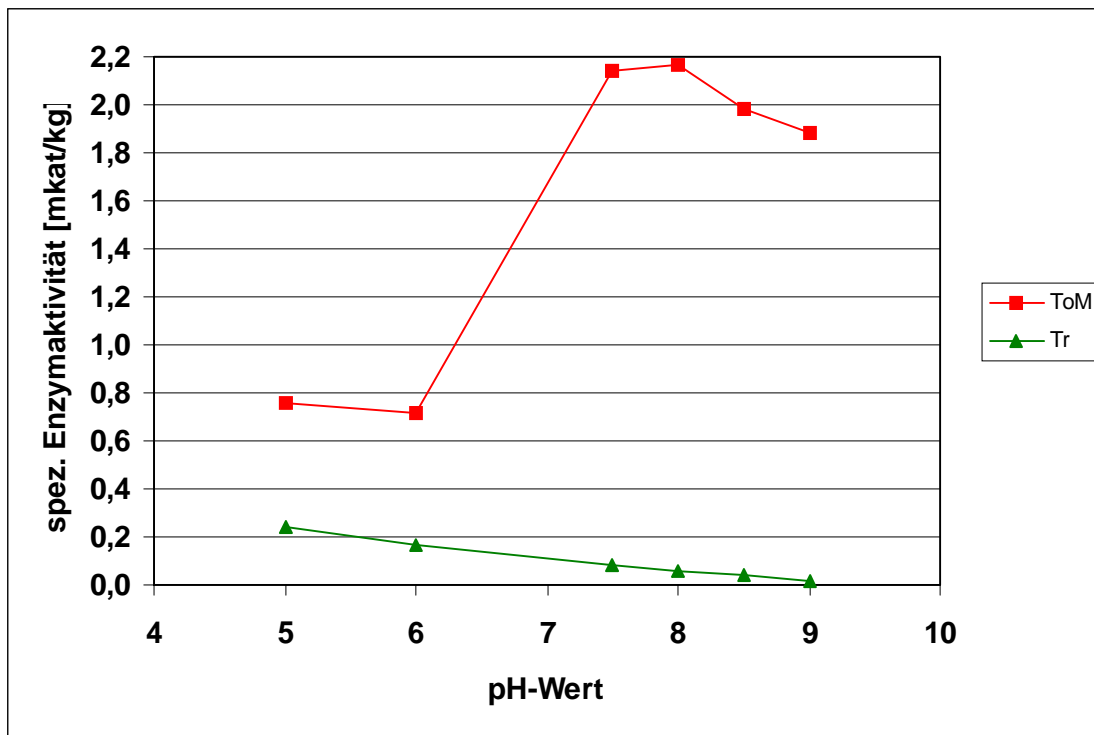


Abb. 22: Spezifische Enzymaktivitäten der PPO der beiden Tomatenkulturen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Als Puffer wurde 0,1 M Tris/HCl verwendet. (ToM = Protein aus der nicht-transgenen Kultur / Tr = Protein aus der transgenen Kultur)

3.4.2 Temperaturabhängigkeit der PPOs aus beiden Tomatenzelllinien

Die Temperaturabhängigkeit der Monophenolasereaktion der Enzymextrakte der beiden Tomatenzellsuspensionskulturen wurde für die pH-Werte 4,5 und 7,5 im Enzymtestansatz bestimmt. Das Temperaturoptimum für die Monophenolaseaktivität der PPOs (Abb. 23) der transgenen Tomatenzellsuspensionskultur bei einem pH-Wert von 4,5 im Reaktionsansatz liegt bei 35°C. Bei einem pH-Wert von 7,5 ist nur eine sehr geringe Enzymaktivität meßbar.

Im Enzymextrakt der nicht-transgenen Zellkultur (Abb. 24) wurde bei einem pH-Wert von 4,5 im Reaktionsansatz eine optimale Inkubationstemperatur von 45°C bestimmt. Bei einem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz ist das Temperaturoptimum nicht eindeutig zu bestimmen. Es liegt im Bereich von 35°C.

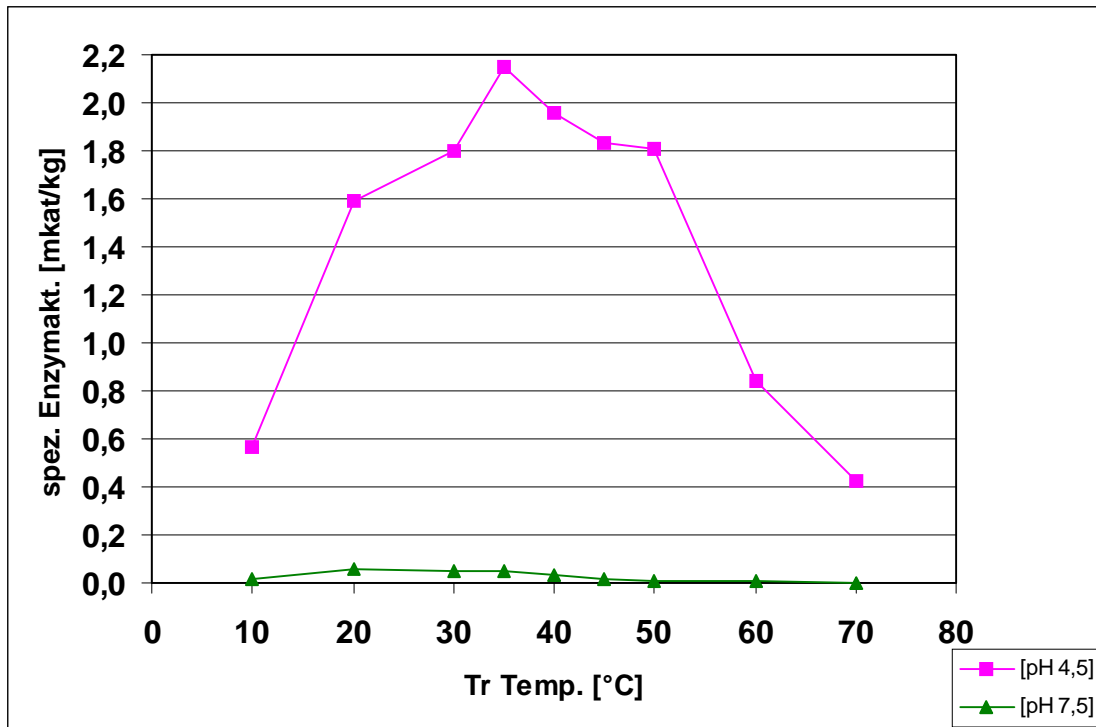


Abb. 23: Monophenolaseaktivität im Enzymextrakt der transgenen Tomatenkultur bei den pH-Werten 4,5 und 7,5 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.

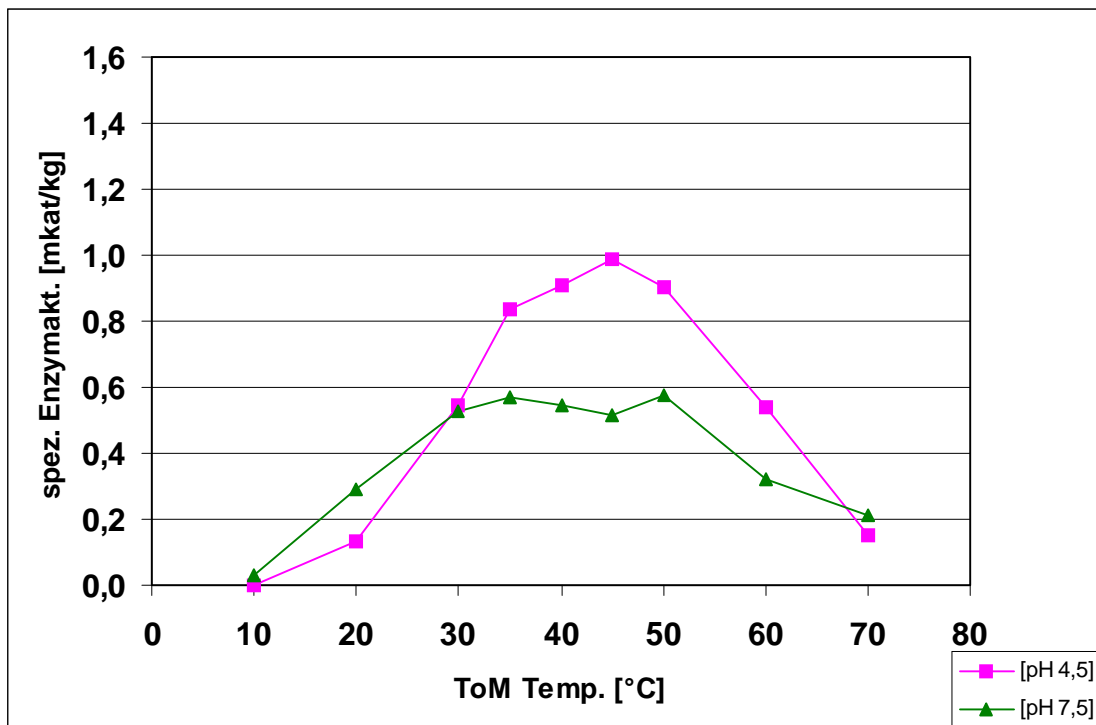


Abb. 24: Monophenolaseaktivität im Enzymextrakt der nicht-transgenen Tomatenkultur bei den pH-Werten 4,5 und 7,5 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.

3.4.3 Monophenolaseaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Die Monophenolaseaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zeigt einen sigmoiden Verlauf. In der Abbildung 25 ist die Akkumulation der Kaffeesäure über die Zeit dargestellt. Die enzymatische Umsetzung der p-Cumarsäure zur Kaffeesäure wurde bei einem pH-Wert von 4,5 im Reaktionsmedium durchgeführt. Zu Beginn der Kurve ist eine lag-Phase zu beobachten, die typisch ist für eine Monophenolasereaktion. In der Abbildung 26 ist zum Vergleich der Kurvenverlauf der Kaffeesäureakkumulation durch die PPOs aus der transgenen Kultur dargestellt.

Der sigmoide Verlauf ist bei beiden Kurven zu erkennen. Die Syntheserate für die Kaffeesäure durch den Proteinextrakt aus der nicht-transgenen Zellkultur liegt jedoch um ungefähr das 100-fache über der aus der transgenen Kultur, bei identischen Proteinkonzentrationen.

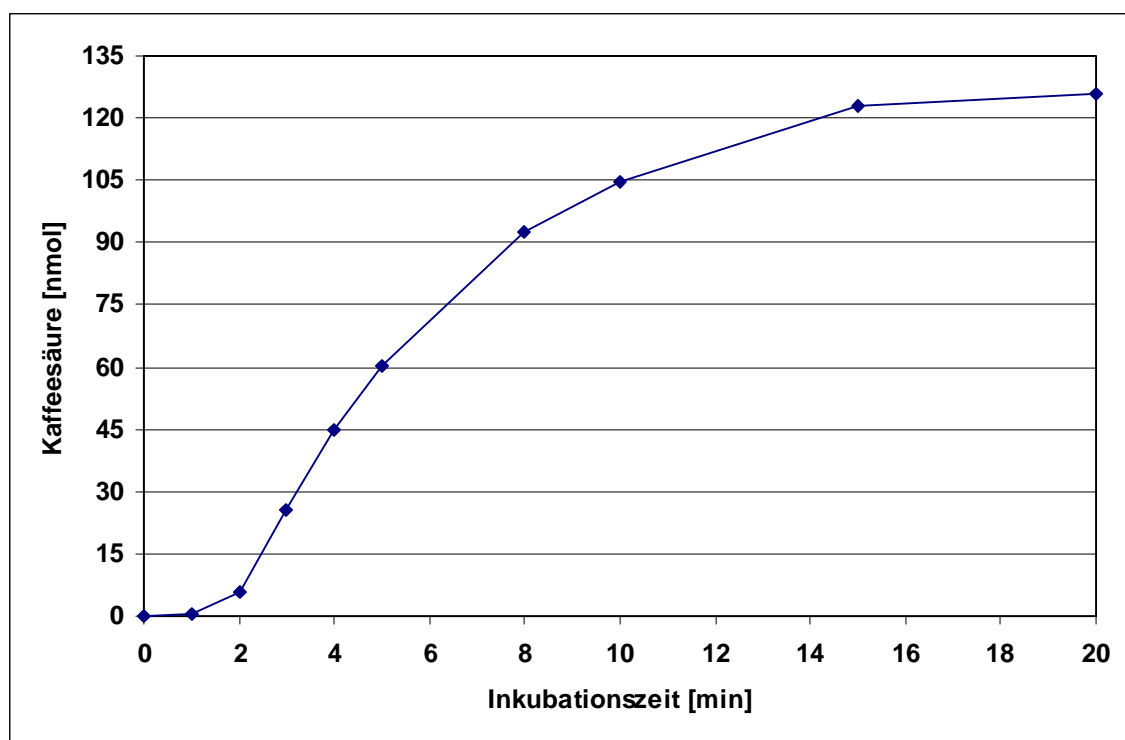


Abb. 25: Zeitabhängigkeit der enzymatischen Kaffeesäuresynthese bei pH-Wert 4,5 mit Enzymextrakt aus der nicht-transgenen Tomatenlinie.

In den Abbildungen 27 und 28 sind die Ergebnisse dargestellt die mit den gleichen Proteinextrakten bei einem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz gemessen wurden. In der Abbildung 27 zeigt der Kurvenverlauf wieder die typisch sigmoide Form für die Abhängigkeit der Kaffeesäurebildung von der Inkubationsdauer, wobei die lag-Phase allerdings kürzer ausfiel als bei pH 4,5. Dieser wurde für die PPOs aus der nicht-transgenen Tomatenzellkultur gemessen.

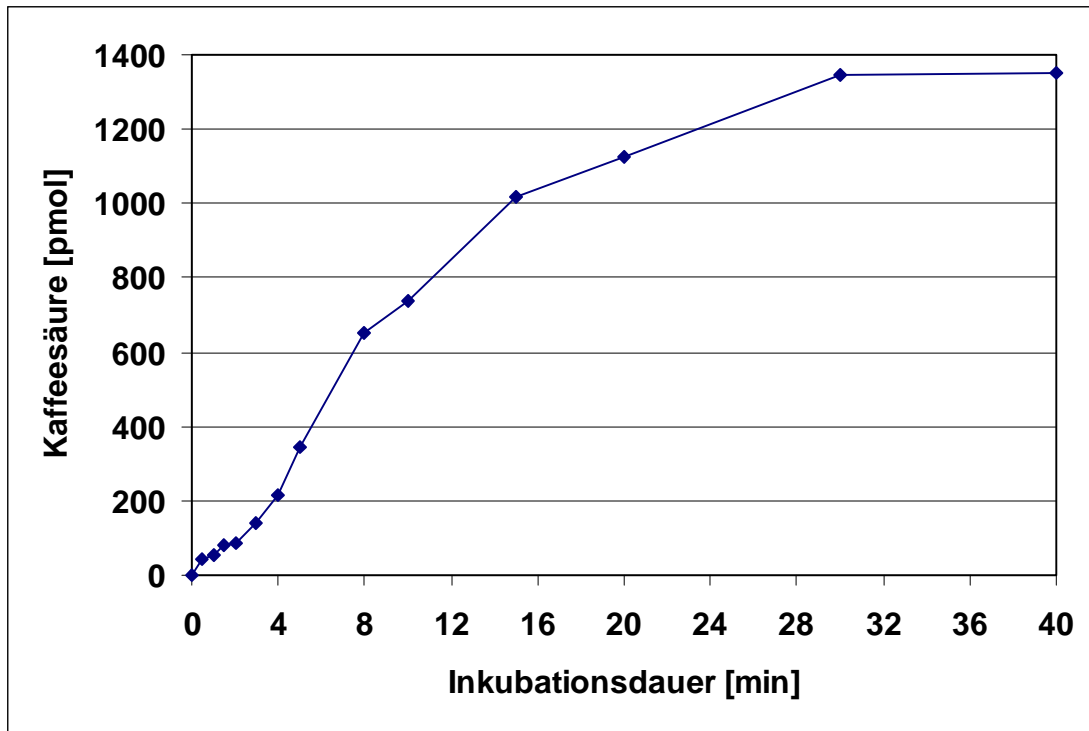


Abb. 26: Zeitabhängigkeit der enzymatischen Kaffeoesäuresynthese bei pH-Wert 4,5 mit Enzymextrakt aus der transgenen Tomatenlinie.

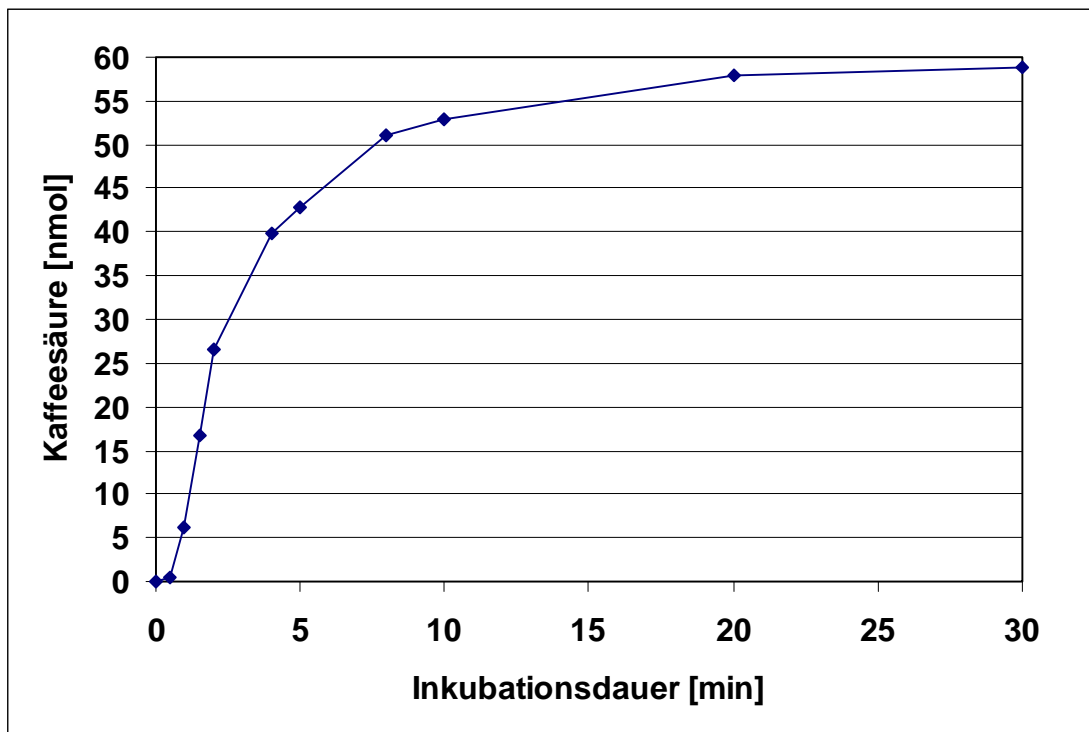


Abb. 27: Zeitabhängigkeit der enzymatischen Kaffeoesäuresynthese bei pH-Wert 7,5 mit Enzymextrakt aus der nicht-transgenen Tomatenlinie.

Für den Proteinextrakt aus der transgenen Kultur (Abb. 28) zeigt sich bei diesem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz, im Vergleich zur nicht-transgenen Kultur, kaum eine Kaffeesäurebildung.

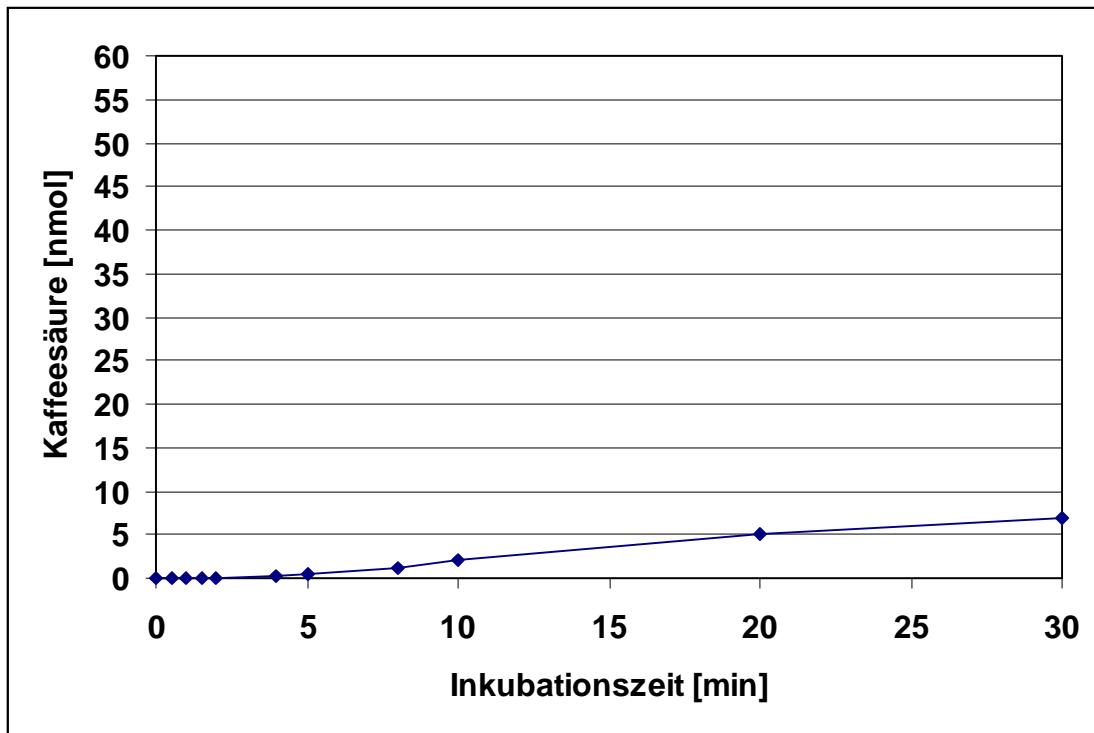


Abb. 28: Zeitabhängigkeit der enzymatischen Kaffeesäuresynthese bei pH-Wert 7,5 mit Enzymextrakt aus der transgenen Tomatenlinie.

3.4.4 Hemmung der Monophenolaseaktivität

Die Monophenolasereaktion läßt sich durch Diethyldithiocarbaminat (DIECA) sehr effektiv hemmen (Abb. 29). In sehr geringen Konzentrationen von 10 μM im Testansatz ist zunächst ein fördernder Effekt zu beobachten. Jedoch bereits ab einer Konzentration von 50 μM DIECA im Reaktionsansatz ist die spezifische Monophenolaseaktivität um fast 50% reduziert.

Dithiotreitol (DTT) übt ebenfalls in geringen Konzentrationen bis zu 20 μM im Reaktionsansatz einen fördernden Einfluß auf die enzymatische Umsetzung von p-Cumarsäure zu Kaffeesäure aus. In höheren Konzentrationen hat DTT jedoch eindeutig eine hemmende Wirkung auf die spezifische Monophenolaseaktivität.

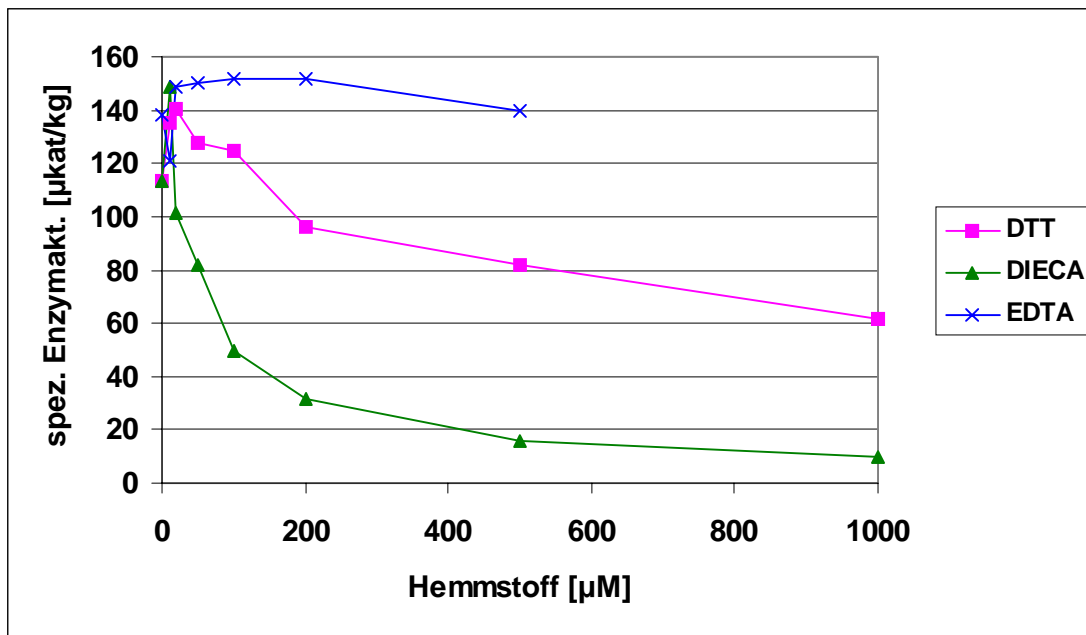


Abb. 29: Einfluß von Dithiotreitol (DTT), Diethyldithiocarbaminat (DIECA) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) auf die spezifische Monophenolaseaktivität des gefällten Proteins des nicht-transgenen Tomatenstamms.

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) hingegen weist keinen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Enzymaktivität der Monophenolasen auf. Bereits geringe Mengen haben einen fördernden Einfluß auf die spezifischen Monophenolaseaktivität.

Bei den PPOs aus der transgenen Kultur (Abb. 30) ist der hemmende Effekt von DIECA ebenfalls klar zu erkennen. Der Hemmeffekt von DTT ist bei diesem Versuch jedoch nicht stark ausgeprägt.

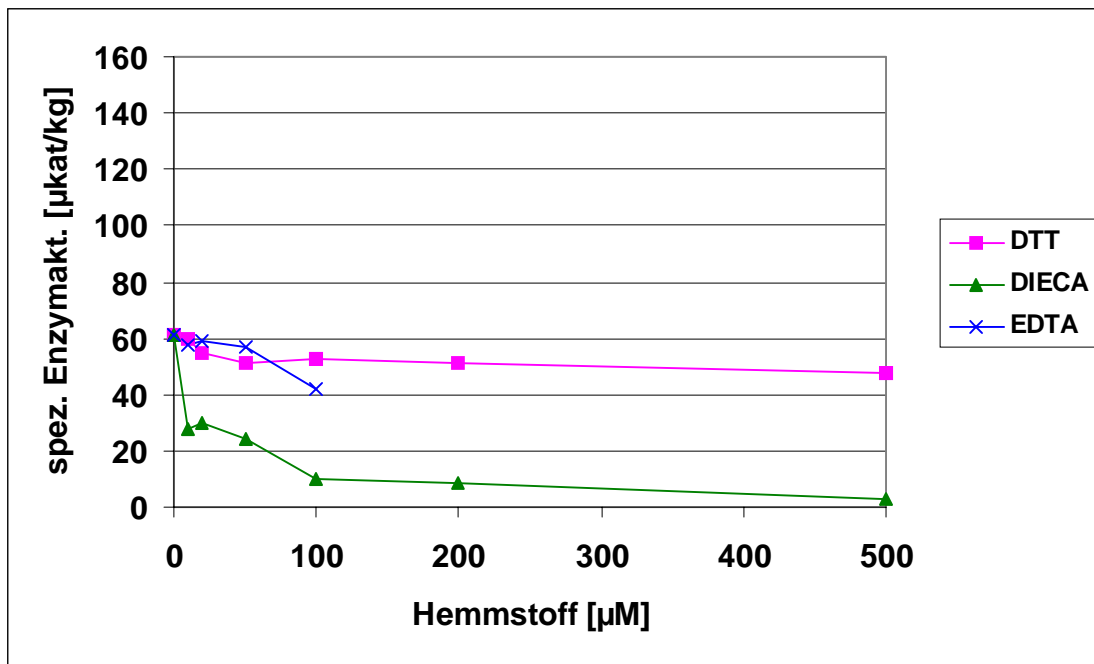


Abb.30: Einfluß von Dithiotreitol (DTT), Diethyldithiocarbaminat (DIECA) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) auf die spezifische Monophenolaseaktivität des gefällten Proteins des transgenen Tomatenstamms.

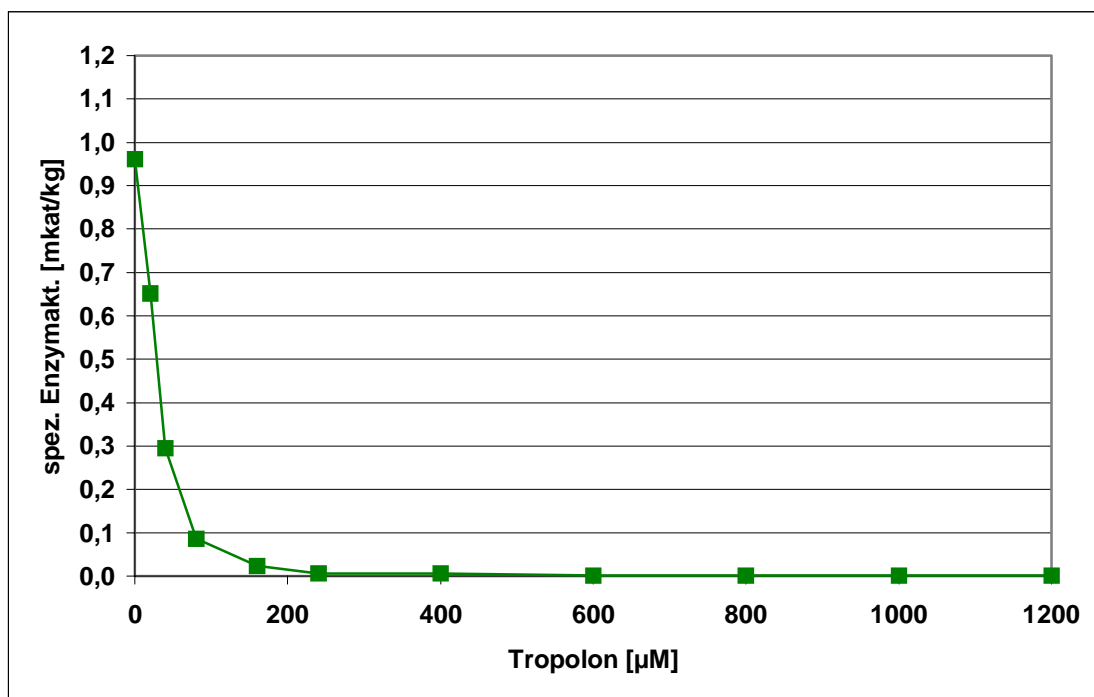


Abb. 31: Einfluß von Tropolon (2-Hydroxy-2,4,6-cycloheptatrienon) auf die spezifische Monophenolaseaktivität der PPOs des nicht-transgenen Tomatenstamms

Tropolon (Abb. 31) zeigt eine sehr starke Wirkung als Inhibitor der Monophenolasereaktion. Die spezifische Enzymaktivität der Monophenolasen im Proteinextrakt des nicht-transgenen Tomatenstammes ist bereits bei einer Konzentration von 80 μM im Reaktionsansatz auf 10% der ursprünglichen Aktivität reduziert. Bei Konzentrationen von über 160 μM im Testansatz ist bereits eine vollständige Hemmung zu beobachten.

In Abbildung 32 sind die Enzymkinetiken nach Lineweaver-Burk in Abhängigkeit vom Substrat p-Cumarsäure dargestellt. In der Reihe I ist kein Tropolon zusätzlich im Enzymtestansatz, in der Reihe II beträgt die Konzentration 10 μM Tropolon, III 20 μM Tropolon und in der Versuchsreihe IV 40 μM Tropolon. Es wurde Enzymextrakt der nicht-transgenen Kultur verwendet.

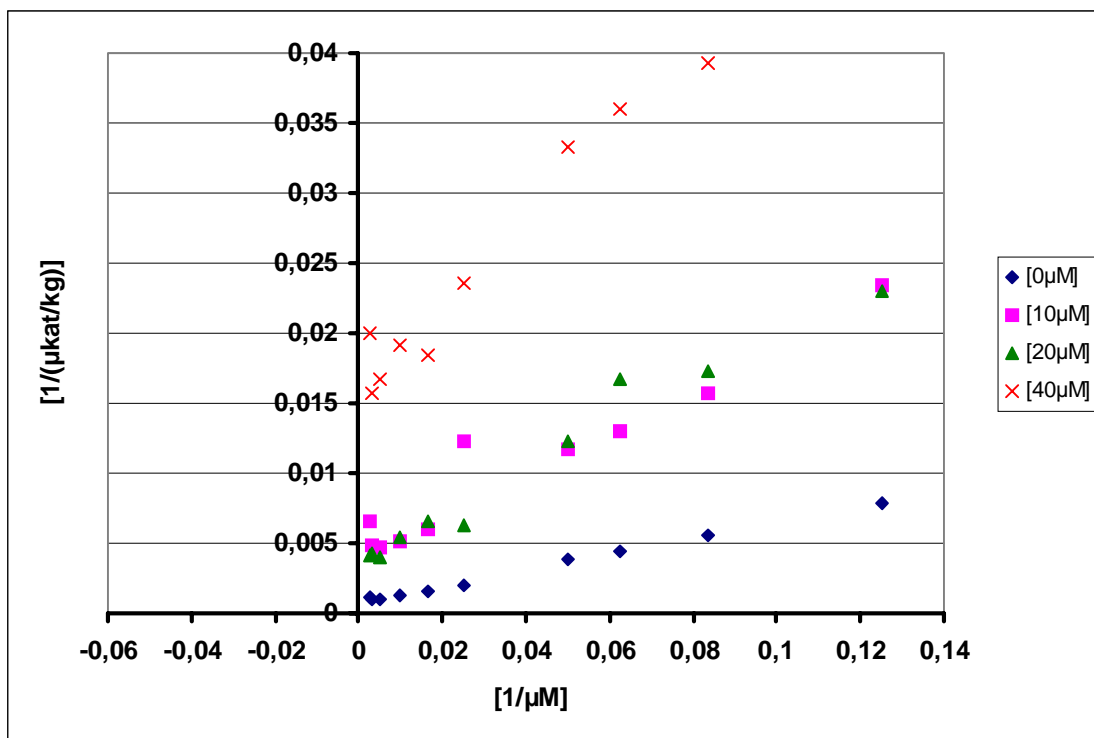


Abb. 32: Enzymkinetiken nach Lineweaver-Burk in Abhängigkeit von p-Cumarsäure. Versuchsreihe I enthält kein Tropolon / II 10 μM Tropolon / III 20 μM Tropolon / IV 40 μM Tropolon im Reaktionsansatz. Verwendet wurde Protein der nicht-transgenen Kultur.

Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden ist nicht ganz eindeutig zu bestimmen. Der Schnittpunkt liegt links der y-Achse, was bedeuten würde, dass es sich um eine Mischhemmung handelt. Eine Mischhemmung bedeutet, dass der Inhibitor einerseits außerhalb des aktiven Zentrums an das Enzym bindet und dadurch eine Anbindung des Substrats an das aktive Zentrum des Enzyms verhindert und andererseits auch als Substratanalogon um die Binderegion mit dem Substrat konkurriert.

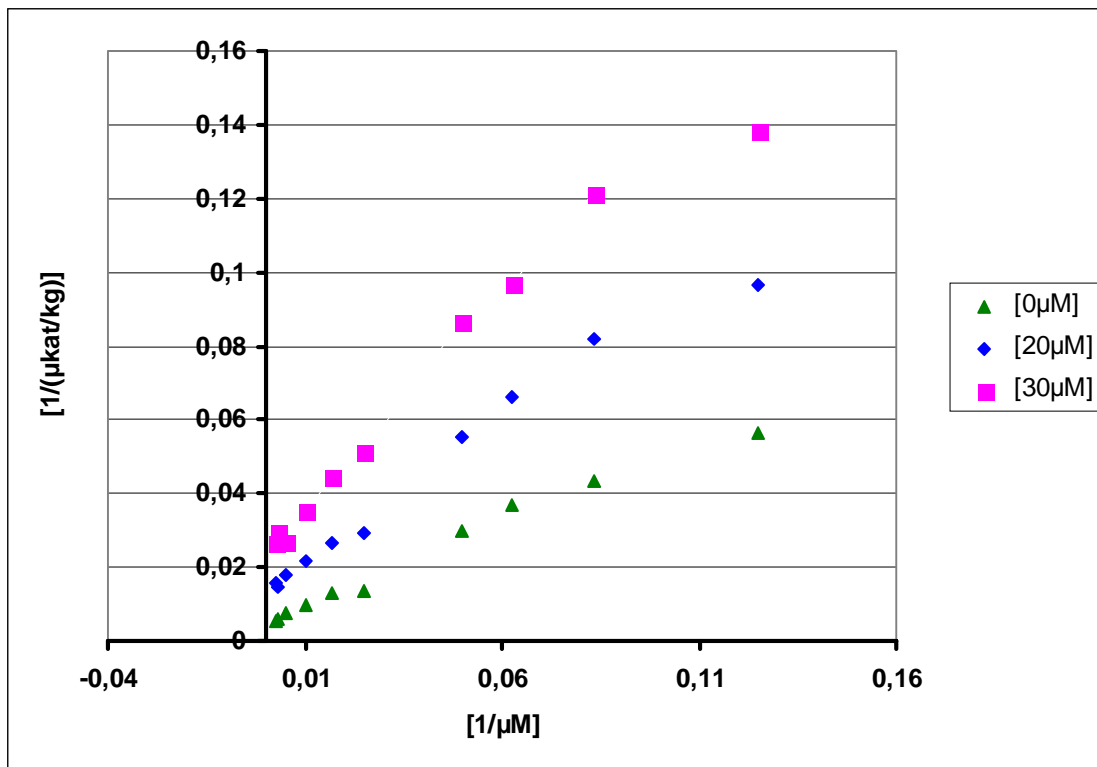


Abb. 33: Enzymkinetiken nach Lineweaver-Burk in Abhängigkeit von p-Cumarsäure. Versuchsreihe I enthält kein Tropolon / II 10 μM Tropolon / III 20 μM Tropolon im Reaktionsansatz. Verwendet wurde Protein der transgenen Kultur.

In der Abbildung 33 sind die Enzymkinetiken in Abhängigkeit vom Substrat p-Cumarsäure nach Lineweaver-Burk dargestellt. Es wurde Protein aus der transgenen Kultur verwendet. In Versuchsreihe I ist kein Tropolon im Versuchsansatz und in den Versuchsreihen II und III beträgt die Tropolonkonzentration 10 μM beziehungsweise 20 μM .

Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden liegt links der y-Achse. Dieser Schnittpunkt kennzeichnet bei einer Darstellung der Enzymkinetiken nach Lineweaver-Burk, ebenfalls wie auch schon bei dem Versuch mit den PPOs aus der nicht-transgenen Kultur, eine Mischhemmung.

3.4.5 Bestimmung der apparenten K_m -Werte

3.4.5.1 Nicht-transgene Kultur: Bestimmung des apparenten K_m -Werts für p-Cumarsäure

Mit gefälltem Protein der nicht-transgenen Kultur wurde der apparente K_m -Wert der PPOs für p-Cumarsäure ermittelt. Es zeigte sich eine Substratsättigungskurve mit Substrathemmung bei p-Cumarsäure-Konzentrationen über 300 μM .

Bei der Berechnung des K_m -Werts ergab sich nach Michaelis-Menten ein apparenter K_m -Wert von 98 μM (Abb. 34) und nach Lineweaver-Burk (Abb. 35) von 104 μM .

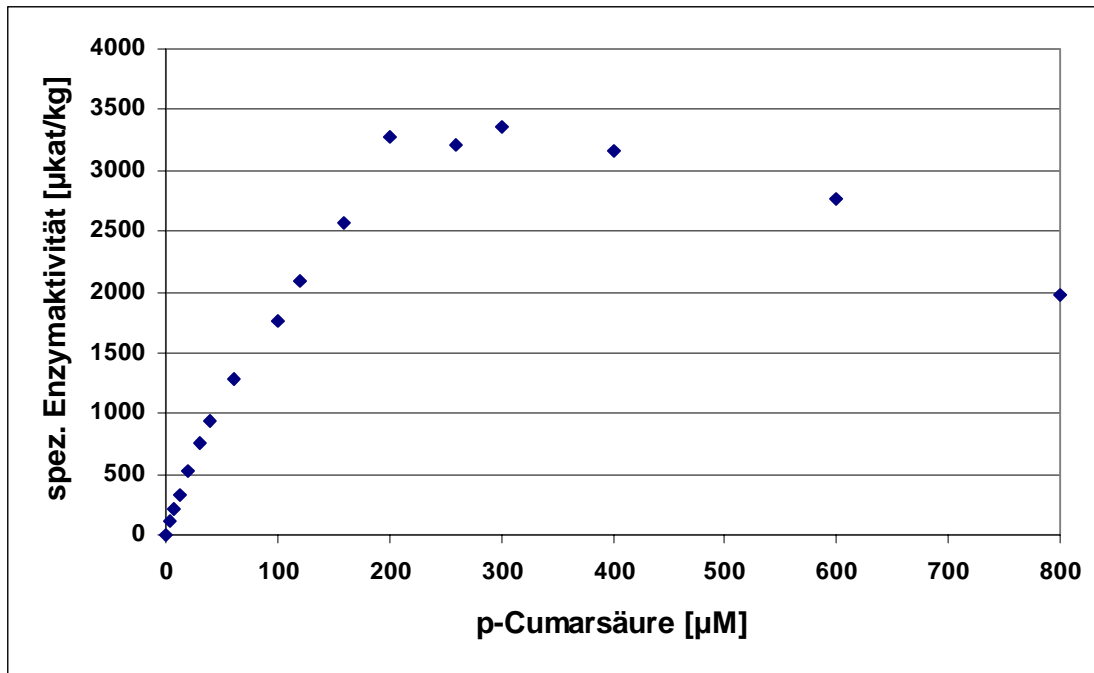


Abb. 34: Substratsättigungskurve für p-Cumarsäure. Es wurde gefälltes Protein der nicht-transgenen Tomatenzelllinie verwendet.

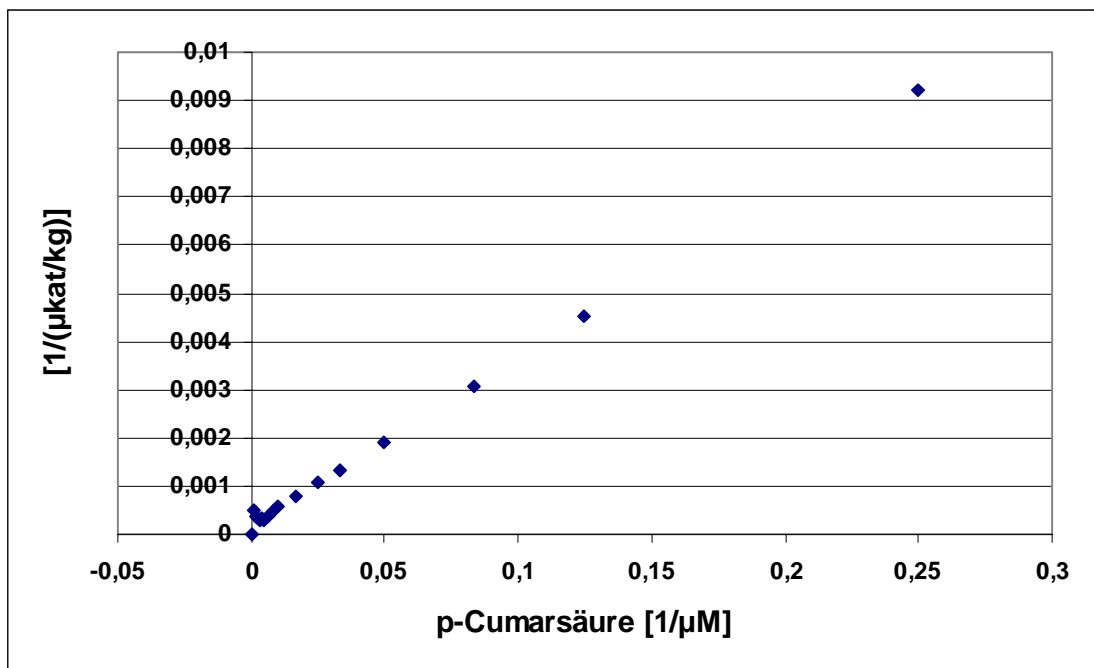


Abb. 35: Darstellung der Daten aus Abb. 34 nach Lineweaver-Burk.

3.4.5.2 Transgene Kultur: Bestimmung des apparenten K_m -Wert für p-Cumarsäure

Bei der Bestimmung des apparenten K_m -Werts für p-Cumarsäure mit Protein der transgenen Tomatenzelllinie ergab sich nach Michaelis-Menten (Abb. 36) ein Wert von 43 μM und nach

Lineweaver-Burk (Abb. 37) von 48 μM . Es tritt ebenfalls eine Substrathemmung ab einer Konzentration von 300 μM p-Cumarsäure auf.

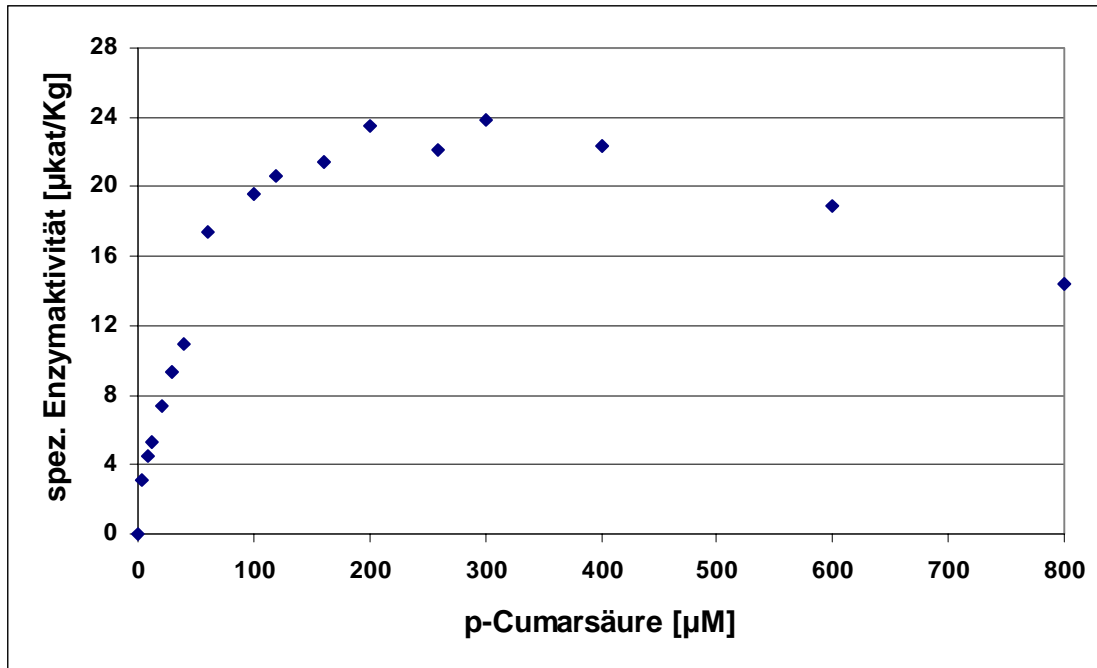


Abb. 36: Substratsättigungskurve für p-Cumarsäure. Es wurde gefälltes Protein der transgenen Tomatenzelllinie verwendet.

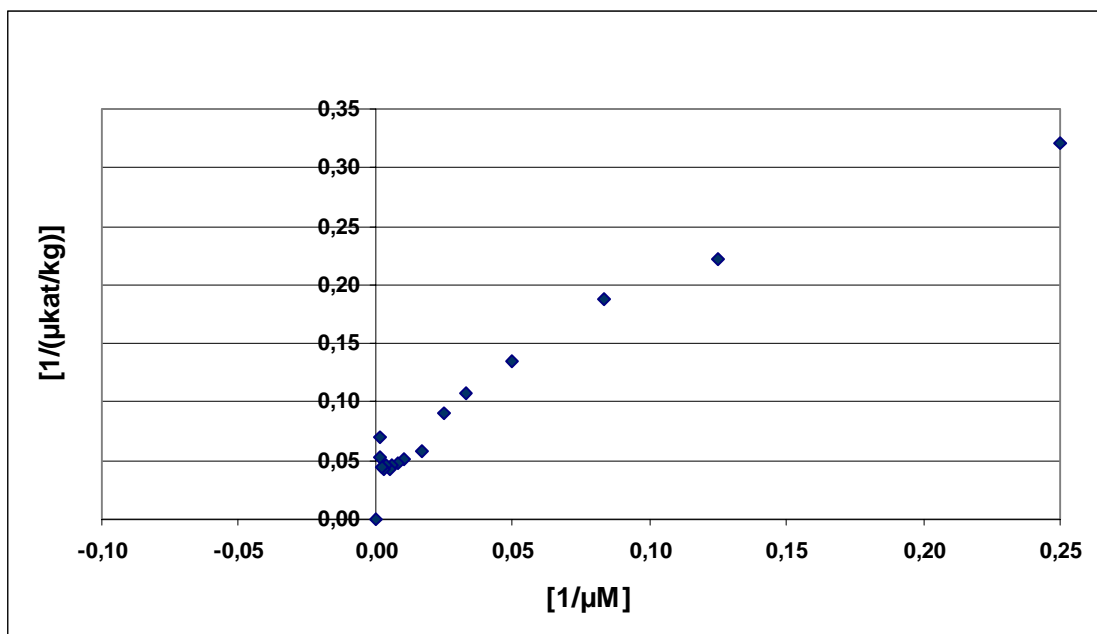


Abb. 37: Darstellung der Daten aus Abb. 36 nach Lineweaver-Burk.

3.5 Untersuchung zur Substratspezifität der PPOs

Um zu überprüfen, welche weiteren Substrate mit einem 4-hydroxylierten Aromaten von den PPOs akzeptiert werden können, wurden außer p-Cumarsäure auch p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat, Tyrosin, 4-Hydroxyphenyllactat, p-Cumarylchinasäure, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxyphenylpyruvat als Substrate für die Monophenolasereaktion getestet. Es wurden dabei Proteinextrakte aus der nicht-transgenen Kultur verwendet.

Nur p-Cumarsäure, p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat, p-Cumarylchinasäure und 4-Hydroxyphenyllactat wurden zu den entsprechenden Dihydroxy-Produkten umgesetzt (Abb.38).

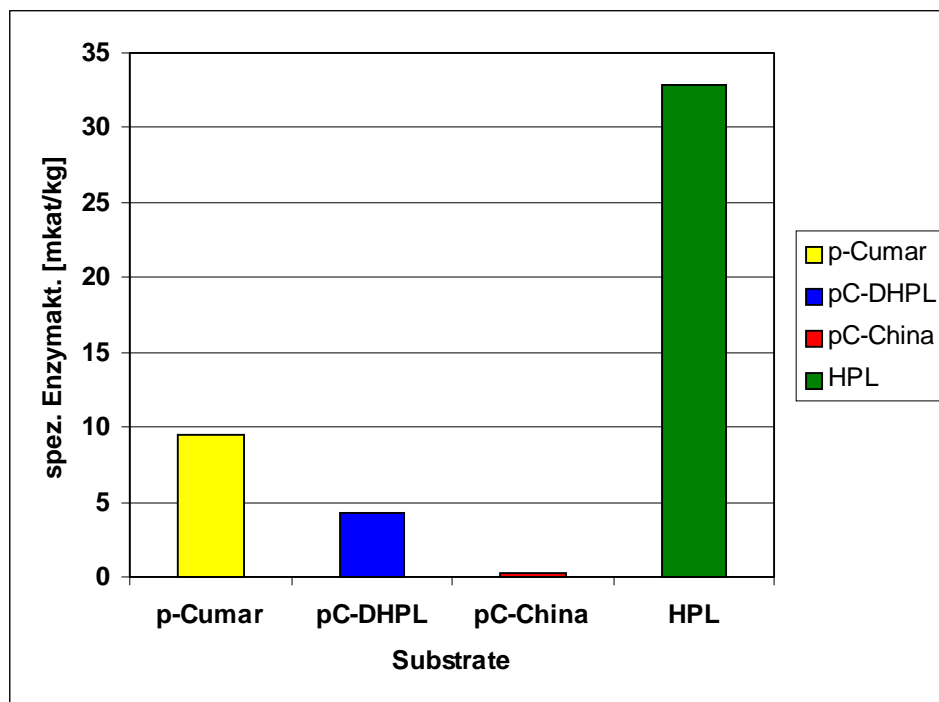


Abb. 38: Spezifische Monophenolaseaktivität bei einem pH-Wert von 4,5 im Reaktionsansatz mit den Substraten p-Cumarsäure (Cumar), p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat (pC-DHPL), p-Cumarylchinasäure (pC-China) und 4-Hydroxyphenyllactat (HPL).

In der Abbildung 38 ist die spezifische Monophenolaseaktivität bei einem pH-Wert von 4,5 im Reaktionsansatz mit den verschiedenen Substraten dargestellt. Die spezifische Enzymaktivität ist bei der Verwendung von Hydroxyphenyllactat als Substrat mit 33 mkat/kg am höchsten. Bei Verwendung von p-Cumarsäure liegt die spezifische Aktivität bei 9,5 mkat/kg. Bei Verwendung der p-Cumarylchinasäure liegt die spezifische Monophenolaseaktivität nur noch bei 200 μ kat/kg.

In der Abbildung 39 sind die entsprechenden spezifischen Monophenolaseaktivitäten bei einem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz dargestellt. Bei diesem pH-Wert liegt die spezifische Enzymaktivität mit 4-Hydroxyphenyllactat deutlich niedriger bei 23 mkat/kg. Für p-Cumarsäure liegt die spezifische Aktivität deutlich höher bei 26 mkat/kg und die mit p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat liegt ebenfalls niedriger bei 2,2 mkat/kg. Die spezifische Monophe-

nolaseaktivität bei Verwendung der p-Cumaryl-Chinasäure liegt mit 300 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ in der gleichen Größenordnung wie bei einem pH-Wert von 4,5.

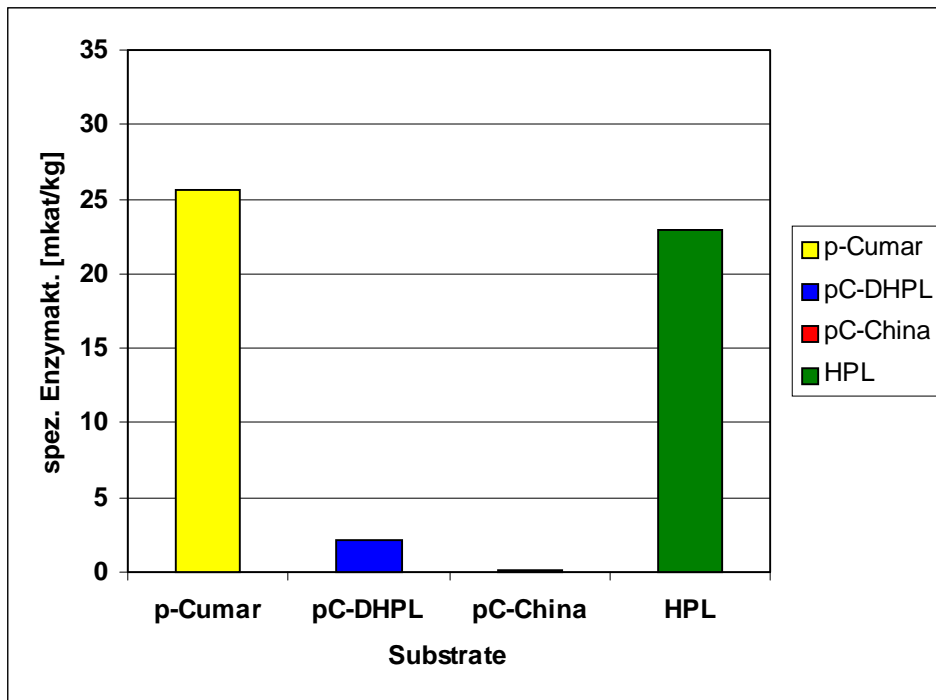


Abb. 39: Spezifische Monophenolaseaktivität bei einem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz mit den Substraten p-Cumarsäure (Cumar), p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat (pC-DHPL), p-Cumarylchinasäure (pC-China) und 4-Hydroxyphenyllactat (HPL).

Die relativen Aktivitäten mit den verschiedenen Substraten im Vergleich zu p-Cumarsäure sind in der Tabelle 10 dargestellt. Es werden die Substrate p-Hydroxyphenyllactat (HPL) und p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat bei den für die Hydroxylierung der p-Cumarsäure optimalen Bedingungen, von den PPOs zu den entsprechenden Dihydroxyverbindungen umgesetzt. Es konnte bei Tyrosin, 4-Hydroxybenzoesäure (HB) oder p-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) keine Umsetzung gemessen werden.

Substrat	Relative Aktivität bei pH 4,5 [%]	Relative Aktivität bei pH 7,5 [%]
p-Cumarsäure	100	100
p-Hydroxyphenyllactat	346,3	89,5
p-Cumaryl-Dihydroxy- Phenyllactat	44,2	8,6
p-Cumarylchinasäure	3,2	0,8
Tyrosin	0	0
p-Hydroxybenzoesäure	0	0
p-Hydroxyphenylpyruvat	0	0

Tab. 10: Relative PPO-Aktivität mit verschiedenen Substraten bei einem pH-Wert von 4,5 und 7,5 im Reaktionsansatz.

3.6 Proteinreinigung

3.6.1 Proteinreinigung der PPOs der nicht-transgenen Kultur

3.6.1.1 Isoformentrennung

Der zweite Schritt der Proteinreinigung nach einer Ammoniumsulfatfällung bestand aus einer Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose als Säulenmaterial. Es wurde gefälltes Protein vom achten Kulturtag aus der nicht-transgenen Tomatenzellsuspensionskultur verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre Monophenolaseaktivität jeweils bei den pH-Werten 4,5 und 7,5 hin untersucht. Die Fraktionen 17 bis 20 zeigten die höchste enzymatische Aktivität bei einem pH-Wert von 4,5. Die Fraktion 18 weist mit 74 pkat die höchste Monophenolaseaktivität auf. Die höchsten spezifischen Enzymaktivitäten (Abb. 40) bei pH 4,5 wurden in den Fraktionen 17 und 18 bestimmt mit 4,7 mkat/kg und 3,4 mkat/kg. Diese Fraktionen wurden ausgewählt, um das Isoenzym über eine Chromatographie über Hydroxylapatit zu reinigen. In diesen Fraktionen liegt auch eine PPO-Aktivität bei einem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz vor. Diese Aktivitäten liegen allerdings niedriger als beim sauren pH-Wert. Die maximale Enzymaktivität findet sich hier in der Fraktion 20 mit 14 pkat.

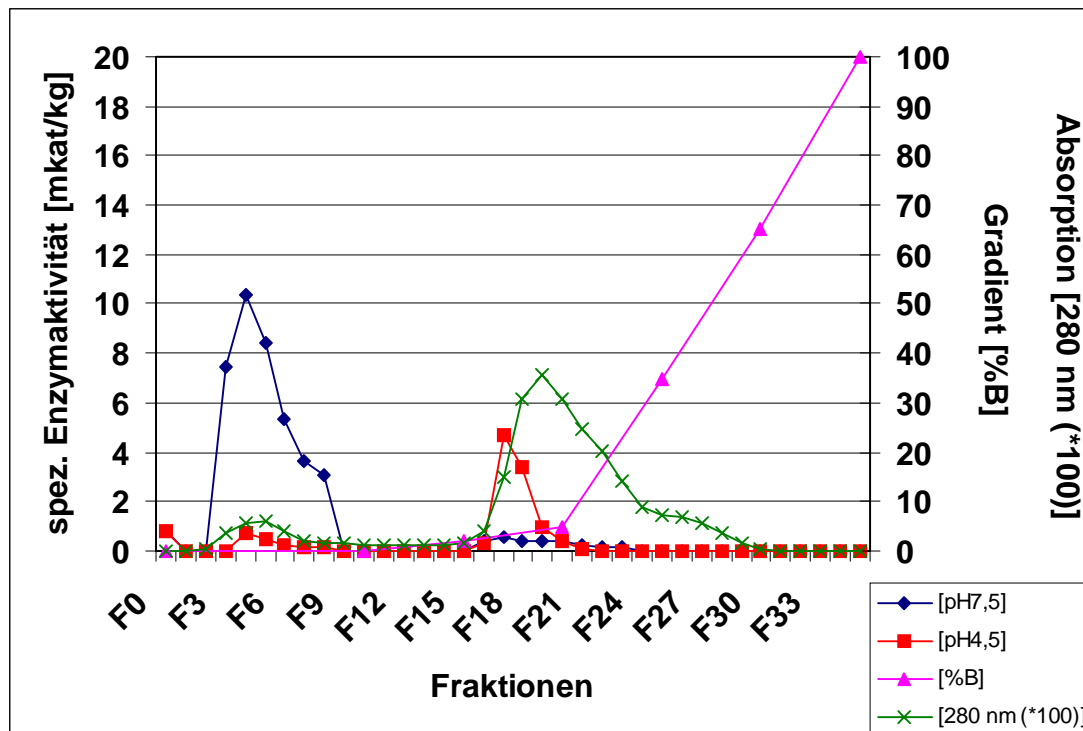


Abb. 40: Spezifische Enzymaktivitäten der Proteinfractionen der nicht-transgenen Tomatenzellkultur bei einem pH-Wert von 4,5 und 7,5. Der Gradient %B entspricht der NaCl-Konzentration in den Fraktionen. Q-Sepharose wurde als Säulenmaterial verwendet. Die Protein-elution wurde anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt.

Bei den Fraktionen 3 bis 8 ist eine hohe enzymatische Aktivität bei pH 7,5 messbar. Die höchste Monophenolaseaktivität weist die Fraktion 4 mit 30 pkat auf.

Die spez. Enzymaktivität in den Fraktionen 3 bis 8 (Abb. 40) ist in der Fraktion 4 mit 10,4 mkat/kg am höchsten. Für die weitere Reinigung des Isoenzym mittels einer Hydroxylapatit-Chromatographie wurden die Fraktionen 3 bis 8 ausgewählt.

3.6.1.2 Hydroxylapatit-Chromatographie der „sauren Isoform“

Die vereinigten Fraktionen 17 und 18 mit der höchsten Monophenolaseaktivität nach der Anionenaustauschchromatographie wurden mittels Hydroxylapatit-Chromatographie weiter gereinigt. Das pH-Optimum der PPO-Isoform dieser Fraktionen bezüglich der Monophenolaseaktivität liegt bei pH 4,5 (saure Isoform).

Die Fraktion 16 weist nach der Reinigung über Hydroxylapatit die höchste Enzymaktivität mit 29 pkat auf. Die spezifische Monophenolaseaktivität in dieser Fraktion (Abb. 41) liegt bei 73 mkat/kg. Die Fraktionen wurden auch hinsichtlich der Monophenolaseaktivität bei einem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz getestet (Abb. 41). Es ist in den Fraktionen keine Monophenolaseaktivität mehr bei diesem pH-Wert im Reaktionsansatz nachweisbar.

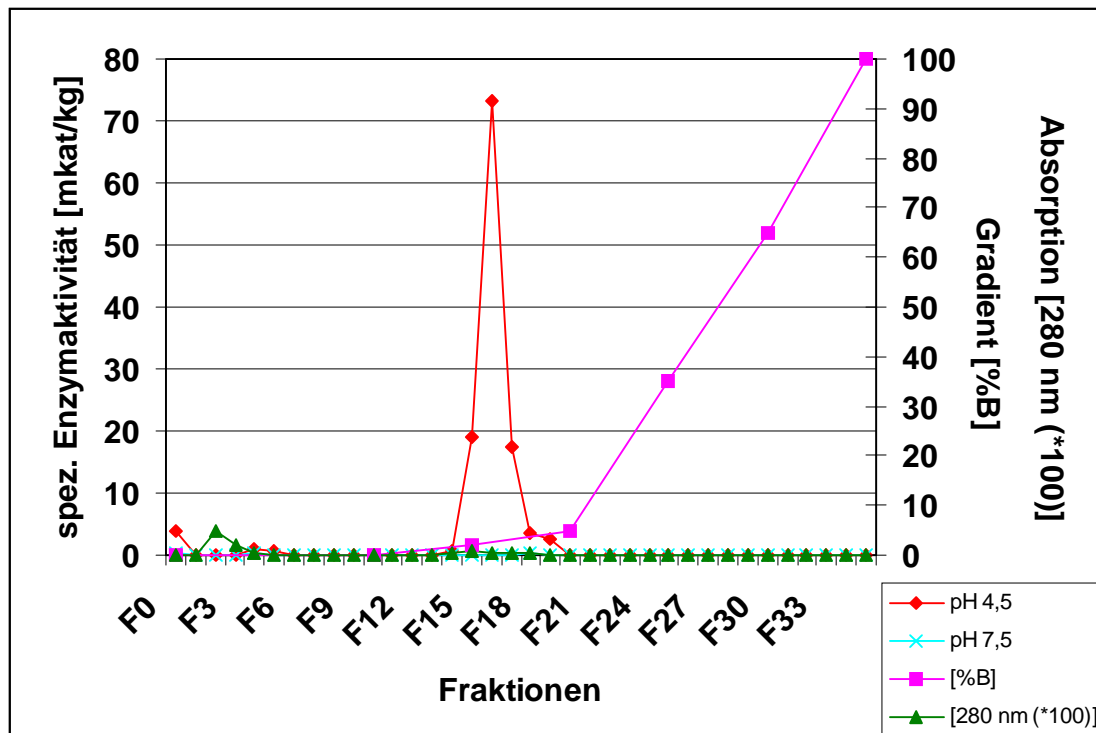


Abb. 41: Spezifische Enzymaktivitäten der sauren Isoform bei Reinigung über Hydroxylapatit. Proteinfraktionen der nicht-transgenen Tomatenzellkultur bei einem pH-Wert von 4,5 und 7,5. Die Proteinelution wurde bei 280 nm beobachtet.

3.6.1.3 Hydroxylapatit-Chromatographie der „neutralen Isoform“

Die vereinigten Fraktionen 3 bis 8 aus der Chromatographie über Q-Sepharose, die eine hohe spezifische Monophenolaseaktivität bei einem pH-Wert von 7,5 (neutrale Isoform) aufweisen, wurden mittels einer Hydroxylapatit-Chromatographie weiter gereinigt. Die Monophenolaseaktivität in den Fraktionen wurde sowohl bei einem pH-Wert von 7,5 als auch bei einem pH-Wert von 4,5 bestimmt. Es wurde ebenso die spezifische Enzymaktivität in diesen Fraktionen bei den entsprechenden pH-Werten ermittelt (Abb. 42).

Die Fraktionen 16 und 17 weisen die höchste spezifische Enzymaktivität mit 60 beziehungsweise 63 mkat/kg bei einem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz auf (Abb. 42). In diesen Fraktionen ist auch eine Monophenolaseaktivität bei einem pH-Wert von 4,5 messbar (Abb.42). Die spezifische Enzymaktivität ist in der Fraktion 17 mit 27 mkat/kg am höchsten.

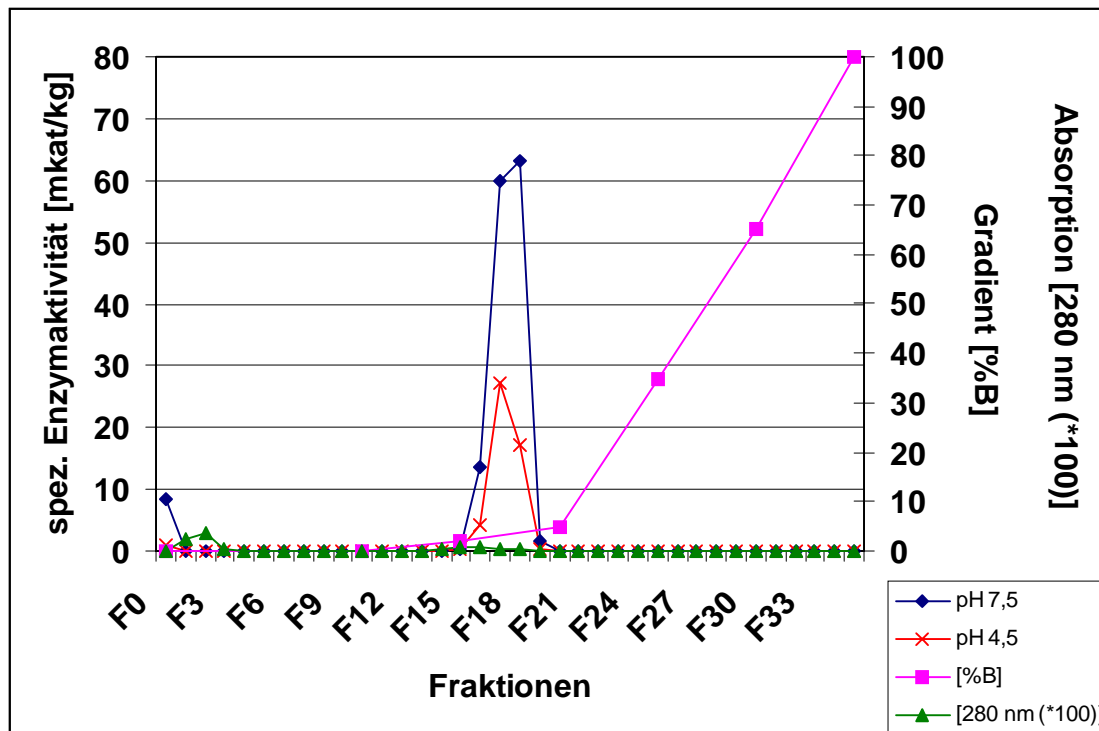


Abb. 42: Spezifische Enzymaktivitäten der neutralen Isoform. Proteinfractionen der nicht-transgenen Tomatenzellkultur bei einem pH-Wert von 7,5 und 4,5 nach der Reinigung über Hydroxylapatit. Die Proteinelution wurde bei 280 nm verfolgt.

Es ergibt sich für die „saure Isoform“ (Tab. 11) ein Reinigungsfaktor von 49 bei einer Ausbeute von 0,5% der Gesamtaktivität, während sich für die „neutrale Isoform“ (Tab. 12) ein Reinigungsfaktor von 5983 bei einer Ausbeute von 97% ergibt.

PPO „saure Isoform“	Protein [mg]	Gesamtaktivität [pkat]	spez. Aktivität [mkat/kg]	Ausbeute [%]	Reinigung (-fach)
Rohextrakt	72,66	107970	1,5	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung 40-75% Sättigung	25,64	38034	1,5	35	1
Q-Sepharose	0,48	2160	4,7	2	3,2
Hydroxylapatit	0,08	586	73,3	0,5	49,2

Tab. 11: Reinigungstabelle für die „saure Phenolaseisoform“ aus der nicht-transgenen Tomatenzellkultur.

PPO „neutrale Isoform“	Protein [mg]	Gesamtaktivität [pkat]	spez. Aktivität [mkat/kg]	Ausbeute [%]	Reinigung (-fach)
Rohextrakt	72,66	619,2	0,01	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung 40-75% Sättigung	25,64	1220	0,05	197	5
Q-Sepharose	0,23	1806	10,38	292	1038
Hydroxylapatit	0,01	598	59,83	97	5983

Tab. 12: Reinigungstabelle für die „neutrale Phenolaseisoform“ aus der nicht-transgenen Tomatenzellkultur.

3.6.2 PPO-Isoformtrennung des Enzymextrakts der transgenen Tomatenzellkultur

Es wurde Enzymextrakt vom achten Kulturtag der transgenen Tomatenzellsuspensionskultur verwendet und über Q-Sepharose gereingt.

Die aufgefangenen Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer Monophenolaseaktivität bei den pH-Werten 4,5 und 7,5 im Reaktionsansatz getestet. Die Monophenolaseaktivität ist bei einem pH-Wert von 4,5 in der Fraktion 20 mit 16 pkat am höchsten. Die spezifische Enzymaktivität in dieser Fraktion (Abb. 43) liegt bei 1,2 mkat/kg und in der Fraktion 19 etwas höher bei 1,3 mkat/kg.

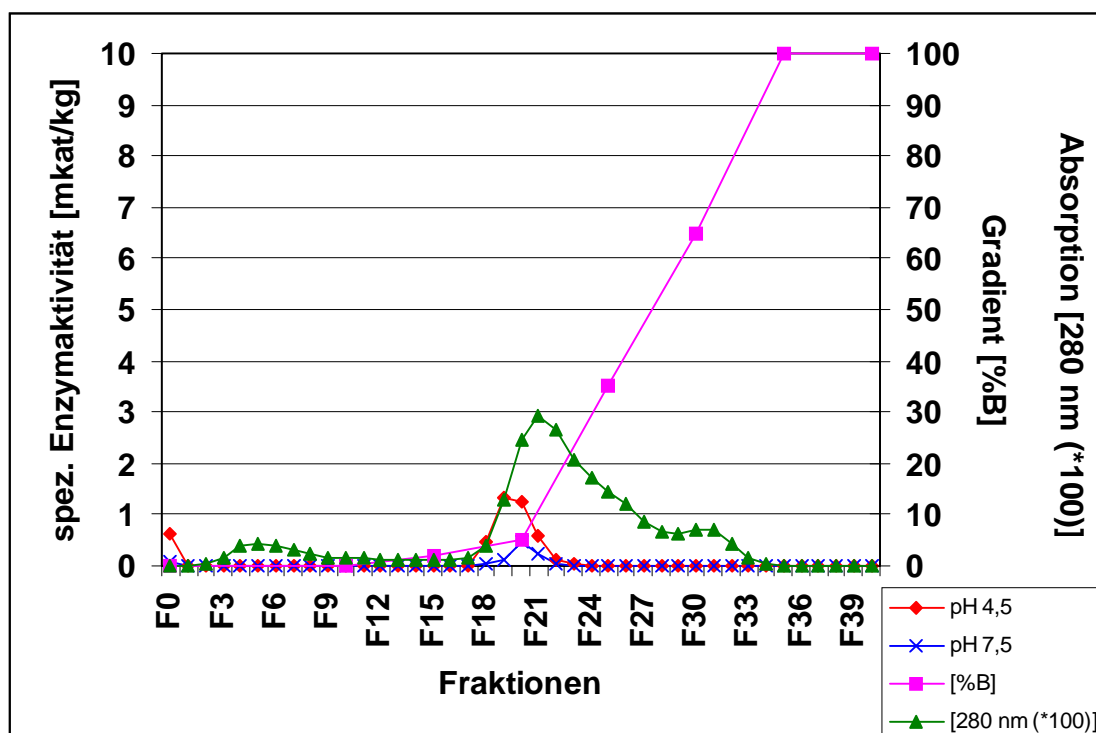


Abb. 43: Spezifische Enzymaktivitäten der Proteinfraktionen der transgenen Tomatenzellkultur nach Trennung über Q-Sepharose bei einem pH-Wert von 4,5 und 7,5. Der Gradient B entspricht der NaCl-Konzentration in den Fraktionen. Die Proteinelution wurde anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt.

Bei einem pH-Wert von 7,5 im Reaktionsansatz betragen die Monophenolaseaktivitäten 8,5 pkat in der Fraktion 19 und 13 pkat in der Fraktion 20. In den Fraktionen 3 bis 8 sind bei der transgenen Kultur keinerlei Monophenolaseaktivitäten meßbar, weder bei einem pH-Wert von 4,5 noch bei einem pH-Wert von 7,5.

3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der partiell gereinigten Isoformen

In dem Gel wurden neben den Größenstandards (LMW-Marker) in den Spuren 1 und 6 auch die verdünnten Proteinextrakte aufgetragen (Abb. 44).

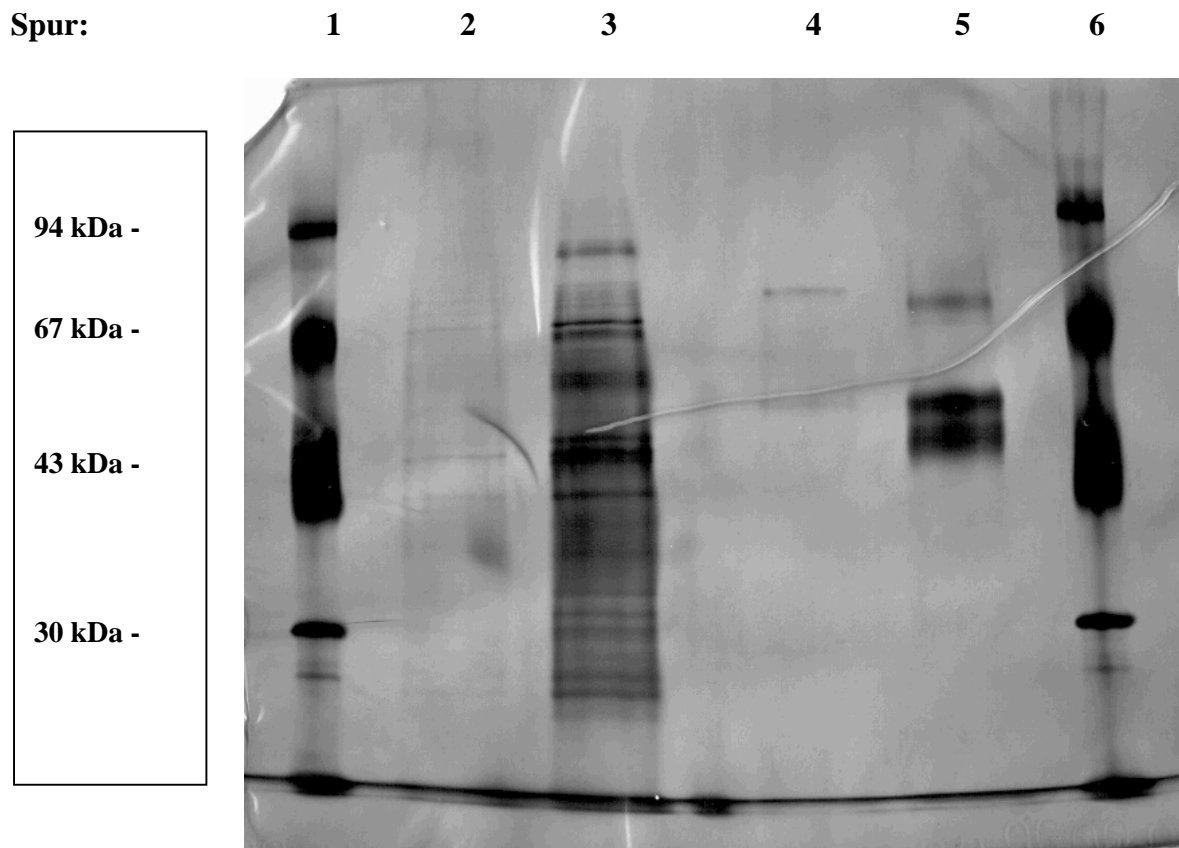


Abb. 44: Das SDS-Polyacrylamidgel zeigt die Proteinextrakte der nicht-transgenen Kultur vor der Reinigung und die gereinigten Fraktionen. Die Spuren 1 und 6 enthalten den Größenstandard. Die Spur 2 zeigt den Proteinextrakt vor der Fällung und die Spur 3 den Extrakt nach Fällung zwischen 45% und 75% Sättigung an Ammoniumsulfat. Die Spur 4 enthält die „saure Isoform“ und die Spur 5 die „neutrale Isoform“.

Die Banden der „sauren Isoform“ die in der Spur 4 zu erkennen sind, ergeben Proteingrößen von 78 kDa für die obere Bande und 60 kDa für die untere Bande. In der Spur 5 sind drei Banden zu erkennen. Die oberste besitzt ebenfalls eine Größe von ca. 78 kDa, die zweite von ebenfalls 60 kDa und die dritte von 52 kDa. Enzymreaktionen im Gel (s.K. 2.3.1.3) nachzuweisen gemäß der Vorschrift von Vaughan und Butt (1969) führten zu keinem

positiven Ergebniss, weder nach einer SDS-Gelelektrophorese, noch nach einer Elektrophorese mit einem nativen Gel. Es konnte in einem Vorversuch wohl ein mit Kaffeesäure inkubiertes Gel gefärbt werden. Diese Färbung war recht schwach und war nicht beständig. Möglicherweise waren die Enzyme nicht mehr enzymatisch aktiv oder die gebildete Kaffeesäuremengen im Gel waren zu gering und konnten nicht detektiert werden.

3.6.4 Bestimmung der Diphenolaseaktivität

Die Diphenolaseaktivität wurde photometrisch bei 475 nm bestimmt nach dem Verfahren von Shin et al. (1997). Als Substrat wurde Dihydroxyphenylalanin (DOPA) verwendet. Es wurden die Diphenolaseaktivitäten in den Fraktionen getestet, mit denen die Reinigung und Trennung der PPO-Isoformen durchgeführt wurden.

	„saure“ Isoform Absorptionsänderung [$\Delta E/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$]	„neutrale“ Isoform Absorptionsänderung [$\Delta E/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$]
(NH₄)₂SO₄-gefällter Ex- trakt	0,05	0,05
Fraktionen nach Chroma- tographie über Q-Sepha- rose	0,65	2,11
Fraktionen nach Chroma- tographie über Hydroxy- lapatit	0,75	0,80

Tab. 13: Bestimmung der Diphenolaseaktivität für die beiden PPO-Isoformen aus der nicht-transgenen Kultur.

Durch die Chromatographie über die Q-Sepharose wurden die beiden PPO-Isoformen voneinander getrennt. In der Fraktion mit der „sauren“ Isoform, die für die weitere Aufreinigung über Hydroxylapatit (HA) verwendet wurde, ergab sich eine Steigerung der Aktivität um das 13-fache auf 0,65 [$\Delta E/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$] (Tab. 13). Bei der „neutralen“ Isoform wird eine Steigerung um das 42-fache erreicht (Tab. 13). Nach der Chromatographie über Hydroxylapatit steigert sich die Diphenolaseaktivität in der Fraktion der sauren Isoform noch leicht, während sie in der Fraktion der „neutralen“ Isoform stark abnimmt, aber immer noch um das 16-fache über der im (NH₄)₂SO₄-gefällten Protein gemessenen Diphenolaseaktivität liegt.

	„saure“ Isoform Absorptionsänderung [$\Delta E/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$]	„neutrale“ Isoform Absorptionsänderung [$\Delta E/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$]
(NH₄)₂SO₄-gefällter Ex- trakt	0,02	-
Fraktionen nach Chroma- tographie über Q-Sepha- rose	0,76	-
Fraktionen nach Chroma- tographie über Hydroxyl- apatit	0,50	-

Tab. 14: Bestimmung der Diphenolaseaktivität für die beiden PPO-Isoformen aus der transgenen Kultur.

In der transgenen Kultur liegt nur die „saure“ Isoform vor. Die Ergebnisse zur Diphenolaseaktivität in der transgenen Kultur (Tab. 14) sind vergleichbar mit denen aus der nicht-transgenen Kultur. Die Diphenolaseaktivität der „sauren“ Isoform steigert sich nach der Reinigung über Q-Sepharose auf 0,76 [$\Delta E/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$]. Da die Ausgangsaktivität in der transgenen Kultur geringer ist, ergibt sich ein höherer Reinigungsfaktor von 38. Hier ist nach der Reinigung über Hydroxylapatit allerdings ein Verlust der Aktivität zu beobachten. Es ergibt sich nur noch eine Absorptionsänderung von 0,5 Einheiten [$\Delta E/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$].

3.7 RT-PCR

Nachdem die Northern-Hybridisierungen mit spezifischen Oligonucleotiden bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen nicht erfolgreich war, weil vermutlich die mRNA im Gesamt-RNA Extrakt zu gering konzentriert war, wurde eine RT-PCR (RT = reverse Transkriptase) durchgeführt. Nach der RT-PCR mit den Primerkombinationen Ps2 / PPOas und Pas2 / PPOs konnte mit der ersten Primerkombination sowohl bei den Proben mit der cDNA der transgenen Kultur als auch der nicht-transgenen Kultur je ein PCR-Produkt (Abb. 45) isoliert werden.

In der Spur 3 ist das PCR-Produkt aus der nicht-transgenen Kultur, welches mit den Primern Ps2 und PPOas erhalten wurde, zu sehen. Es weist eine Länge von etwa 800 bp auf. Die Annealingtemperatur betrug 56°C, der gleiche Ansatz (Spur 1) mit einer Annealingtemperatur von 52°C führte zu keinem Amplifikat. In der Spur 8 ist das PCR-Produkt zu erkennen, welches mit der Primerkombination Ps2 und PPOas bei einer Annealingtemperatur von 56°C mit cDNA aus der transgenen Kultur erhalten wurde. Dieses PCR-Produkt ist ungefähr 850 bp lang. Der analoge Ansatz bei einer Annealingtemperatur von 52°C (Spur 6) führte zu keinem Amplifikat. Mit der Primerkombination Pas2 / PPOs (Spuren 2; 4; 7; 9) wurde bei keiner der beiden Annealingtemperaturen ein Amplifikat gefunden.

Es wurde versucht, die erhaltenen Amplifikate zu klonieren. Nach der Transformation konnten drei weiße Kolonien selektiert werden, in denen jedoch nach Plasmidisolierung und Restriktionsverdau kein Insert gefunden wurde.

Spur: 1 2 3 4 5 6 7 8 9

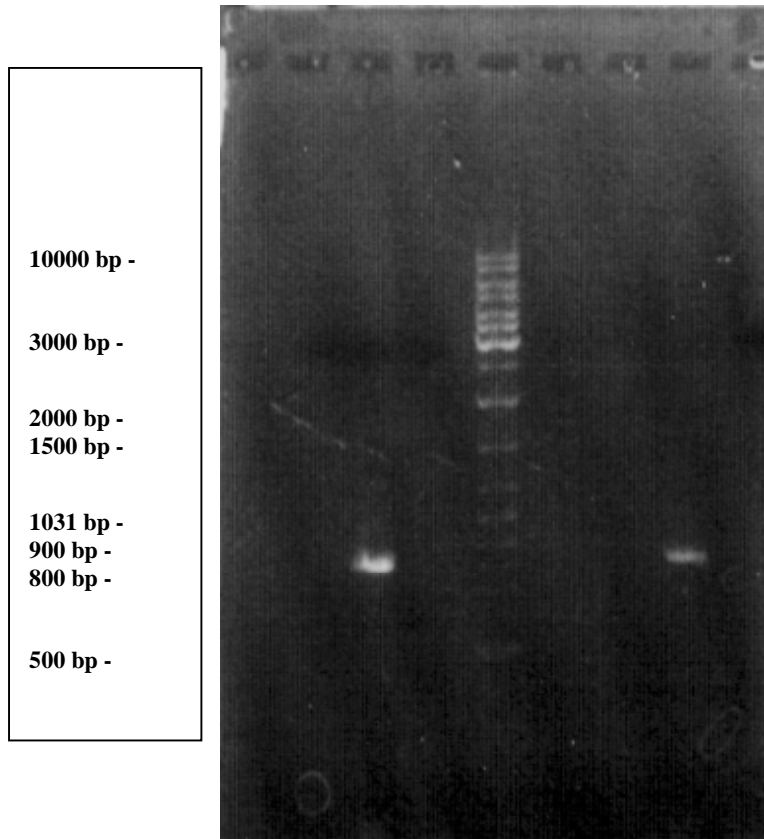


Abb. 45: 1% Agarose-Ethidiumbromid-Gel: In den Spuren 1 – 4 wurden die RT-PCR-Ansätze mit cDNA der nicht-transgenen Kultur aufgetrennt. Die Spur drei enthält den Ansatz mit den Primern Ps2 und PPOas; das PCR-Produkt hat eine Größe von circa 800 bp. In der mittleren Spur 5 ist der Größenmarker Gene Ruler von MBI Fermentas. Die Spuren 6 – 9 enthalten die RT-PCR-Ansätze mit cDNA der transgenen Kultur. Die Spur 8 enthält ein PCR-Produkt von ungefähr 850 bp, welches mit den gleichen Primern wie bei Spur 3 erhalten wurde. Die Annealingtemperatur der Proben in den Spuren 3, 4, 8 und 9 betrug 56°C, in den anderen 52°C.

4 Diskussion

4.1 Inhaltsstoffanalytik

Im Rahmen der Inhaltsstoffanalytik sollten Vorkommen und Gehalte einiger phenolischer Verbindungen in den beiden Tomatenzelllinien untersucht werden. In beiden Zellkulturen liegen große Mengen Chlorogensäure vor. Bereits Elliger et al. (1981) beschrieben das Vorkommen von Kaffeoylestern in Tomatenblättern. Bernards et al. (1991) beschrieben ebenfalls, dass Chlorogensäure eines der am häufigsten vorkommenden phenolischen Verbindungen in Tomatenzellkulturen ist. Dieses Ergebnis läßt sich mit den gewonnenen Daten der beiden in dieser Arbeit verwendeten Tomatenzelllinien in Einklang bringen. Allerdings konnten nicht sämtliche im Chromatogramm detektierten Substanzen identifiziert werden. In *Cynara scolymus* liegt neben der Chlorogensäure auch die bitter schmeckende 1,3-Dicaffeoyl-chinasäure (Cynarin) vor (Rimpler, 1999) und auch die 1,5-Dicaffeoylchinasäure. Durch die saure Hydrolyse konnte auch belegt werden, dass es sich um Chlorogensäure handelt. Nach der sauren Hydrolyse liegt keine Chlorogensäure mehr im Extrakt vor, während sich der Anteil der Kaffeesäure dementsprechend erhöht hat.

In der nicht-transgenen Kultur konnte, im Gegensatz zur transgenen Kultur, keine frei vorliegende p-Cumarsäure detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass es hinsichtlich des Phenolstoffwechsels in beiden Kulturen Unterschiede gibt. Dies wird auch belegt durch den signifikant höheren Anteil an Ferulasäure in der nicht-transgenen Kultur. Es scheint, dass in der transgenen Kultur mehr p-Cumarsäure akkumuliert wird, während in der nicht-transgenen Kultur Ferulasäure dominiert. In der transgenen Tomatenzelllinie wird wesentlich mehr Chlorogensäure akkumuliert, dies könnte mit der geringeren Menge an Ferulasäure in Verbindung stehen.

In beiden Tomatenzelllinien liegen phenolische Substanzen auch glucosidiert vor. In der nicht-transgenen Tomatenzelllinie liegt vor allem Ferulasäure glucosidiert vor und, wenn auch deutlich weniger, p-Cumarsäure. In der transgenen Tomatenzelllinie liegt die Ferulasäure in deutlich geringeren Mengen vor, dagegen liegt p-Cumarsäure in größeren Mengen glucosidiert vor als in der nicht-transgenen Zelllinie. Dies passt zu den Erkenntnissen, die in den Versuchen zuvor gewonnen wurden. Die Chlorogensäure liegt in beiden Zelllinien nicht als Glucosid vor. In der transgenen Kultur kommt eine deutlich höhere Menge Chlorogensäure vor.

In beiden Tomatenzelllinien liegt auch der Hauptteil der Kaffeesäure glucosidiert vor. In der nicht-transgenen Kultur ist der Gehalt an glucosidierter Kaffeesäure höher. Dass beträchtliche Mengen Kaffeesäure glucosidiert vorliegen, konnten auch Bernards et al. (1991) belegen. Zudem zeigten sie, dass nach einer Abwehrreaktion der Tomaten auf eine Pilzinfektion mit *Verticillium albo atrum* der Anteil an glucosidierter Kaffeesäure deutlich anstieg und Chlorogensäure abgebaut wurde. Bernards et al. (1991) vermuteten, dass die Chlorogensäure als Kaffeesäurereservoir für eine Pathogenabwehr dient. Keller et al. (1996) identifizierten p-Cumarsäure und Ferulasäure als zellwandgebundene phenolische Substanzen in Zellkulturen von *Solanum tuberosum*. Neben diesen wurden auch weitere phenolische Substanzen nach einer Elicitierung vermehrt in die Zellwand eingebaut, um, wie Keller et al. vermuteten, eine Pathogenattacke abzuwehren. Fleuriet und Macheix (1985) zeigten, dass in Tomatenfrüchten

größere Mengen Chlorogensäure akkumuliert werden und im Laufe des Reifeprozesses der Früchte vermehrt diverse phenolische Substrate glucosidiert werden. Buta und Spaulding (1997) zeigten, dass Chlorogensäure vor allem in noch unreifen Früchten akkumuliert und mit zunehmendem Reifungsgrad abnimmt. Chlorogensäure soll in Früchten das Phytohormon Auxin vor Oxidation schützen (Buta und Spaulding, 1997; Stonier et al., 1979). Im Zusammenhang mit pflanzlichen Zellkulturen ist es schwierig, dazu eine Aussage zu treffen, da in den Kulturmedien beträchtliche Mengen Phytohormone vorliegen und die Ergebnisse verfälschen. Allerdings scheinen die Hormone im Medium nicht die Ursache für die extrem unterschiedlichen Chlorogensäuregehalte der beiden Tomatenzelllinien zu sein, da die Kulturmedien identisch sind und die beiden Zelllinien von der gleichen Tomatensorte stammen. Es ist zu vermuten, dass die eingeschränkte Fähigkeit der transgenen Tomatenzelllinie Ferulasäure zu synthetisieren, durch eine verstärkte Chlorogensäuresynthese kompensiert wird. Da beide Substanzen wohl eine Rolle im Bereich einer möglichen Pathogenabwehr spielen (Keller et al. 1996; Fleuriet und Macheix, 1985; Bernards et al., 1991), liegt diese Vermutung nahe.

4.2 Mikrosomale p-Cumarsäure 3-Hydroxylasen

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht, in den Mikrosomensuspensionen der beiden Tomatenzelllinien eine Cytchrom P450-abhängige 3-Hydroxylaseaktivität zu bestimmen, die p-Cumarsäure in Kaffeesäure umsetzte, wie dies Pommer (2000) mit Mikrosomen aus *Zea mays* gelang. Schoch et al. (2001) gelang es, ein Gen in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren, das eine 3-Hydroxylase codiert, die nur p-Cumaryl-Chinasäure oder p-Cumaryl-Shikimisäure in die entsprechenden Kaffeesäurederivate umsetzte, nicht jedoch p-Cumarsäure oder ihren CoA-Ester. Die Expression dieses Gens ist assoziiert mit der Lignifizierung. Franke et al. (2002) identifizierten über eine knock out Mutante von *Arabidopsis thaliana* ein C3H Gen und konnten dieses in Hefezellen klonieren. Die daraus isolierte Hydroxylase konnte p-Cumarsäure in Kaffeesäure umsetzen. Die Cytochrom P450-abhängige Hydroxylase wies allerdings nur eine sehr geringe Aktivität gegenüber p-Cumarsäure und p-Cumarylaldehyd als Substrat auf. Deutlich besser wurde p-Cumarylmethylester als Substrat akzeptiert.

4.3 Enzymparameter

Bei der Bestimmung der Enzymparameter deuten die Ergebnisse aus der Ermittlung des optimalen pH-Werts (S. 46/47 Abb. 21/22) der Monophenolasereaktion darauf hin, dass es sich nicht nur um eine PPO-Isoform handeln kann, die sich im Enzymrohextrakt des nicht-transgenen Tomatenstamms befindet. Es ist anzunehmen, dass es sich um Isoenzyme handelt. Newman et al. (1993) beschrieben, dass die PPOs bei *Lycopersicon esculentum* durch eine Genfamilie codiert wird, die auf dem Chromosom acht lokalisiert ist. Die Genfamilie besteht aus sieben Abschnitten die einer differenzierten Expression unterliegen, wie Thipyapong et al. (1997 b) zeigten. Daher konnte bereits aufgrund der unterschiedlichen Expression der einzelnen PPO-Gene von PPO-Isoformen ausgegangen werden. Sommer et al. (1994) zeigten, dass PPOs beim Transport ins Thylakoidlumen von einem 67 kDa großen Protein zu einem 59 kDa großem Protein prozessiert werden. Sie wiesen die PPOs durch Polyclonale Antikörper nach, untersuchten allerdings nicht welche der PPOs enzymatisch aktiv sind.

Die beiden pH-Optima bei 4,5 und 7,5 für die Monophenolasereaktion liegen in pH-Wert Bereichen, die auch bereits in der Literatur beschrieben wurden. Gomez-Lopez (2002) fand für PPOs aus zwei Avocado Varietäten ebenfalls je zwei pH-Optima bei pH 4,5 und 7,5. Er verwendete Enzymextrakte aus dem Fruchtfleisch der beiden Varietäten. Tremolieres und Bieth (1984) bestimmten die pH-Optima bei 5,5 und 7,5 für PPOs in Proteinextrakten aus Blättern von *Populus nigra*. Wititsuwannakul et al. (2002) fanden für zwei PPO-Isoformen die gleichen pH-Optima bei pH 7. Die Isoformen wurden aus Latex von *Hevea brasiliensis* isoliert. Dincer et al. (2002) fanden ein pH-Optimum für PPO aus *Mespilus germanica* Früchten von 6,5. Espin et al. (1997 a,b,c) beschrieben für PPOs aus Erdbeeren, Artischocken und Birne ein pH-Optimum für die Monophenolasereaktion von 4,3. Mazzafera und Robinson (2000) bestimmten ein pH-Optimum bei pH 6-7 für PPOs aus dem Endosperm und den Blättern von *Coffea arabica*.

Bei der Ermittlung des Temperaturoptimums der Monophenolaseaktivität (S. 48 Abb. 23/ 24) ergab sich für den gefällten Proteinrohextrakt der transgenen Tomatenzellkultur eine optimale Inkubationstemperatur von 35°C und für den Proteinextrakt der nicht-transgenen Tomatenzellkultur von 45°C. Raymond et al. (1993) beschrieben ein Temperaturoptimum von 45°C für PPOs aus Sonnenblumensamen und Wititsuwannakul et al. (2002) konnten für die zwei Isoformen aus *Hevea brasiliensis* den Temperaturbereich von 35–45°C als optimal angeben.

Da in allen Fällen das Temperaturoptimum in unfraktionierten Proteinextrakten, und nicht mit gereinigten Enzymen bestimmt wurde, könnten diese Unterschiede durch die Anwesenheit unterschiedlicher Isoformen im Proteinextrakt erklärt werden. Mazzafera und Robinson (2000) beschrieben bei PPOs aus Blättern und dem Endosperm von *Coffea arabica* eine unterschiedliche Hitzeempfindlichkeit der PPOs in den beiden Extrakten. Die PPOs aus Blättern wiesen eine deutliche Hitzeunempfindlichkeit auf. Bei einer Inkubation der PPOs über 30 Minuten bei 50°C war die anschließend bestimmte Enzymaktivität noch zu 100 % erhalten, während sie bei den PPOs aus dem Endosperm bereits nach wenigen Minuten um 20% abnahm.

Der sigmoide Verlauf der Zeitabhängigkeit der Monophenolasereaktion wurde im Kapitel 3.4.3 für die PPOs aus den beiden Kulturen gezeigt. Diesen typischen Verlauf einer Monophenolasereaktion zeigten auch Espin et al. (1997 c) für PPOs aus Artischocken. Dies lässt sich mechanistisch durch das Vorkommen verschiedener Enzymkonformationen der PPOs erklären (Solomon et al., 1996).

PPOs katalysieren zwei verschiedene Reaktionen, die Monophenolasereaktion und die Diphenolasereaktion (s.a. S. 5 Abb.1). Bei der Diphenolasereaktion werden ortho-Diphenole zu den entsprechenden Chinonen oxidiert. Um diese Reaktion durchzuführen, müssen die zwei Kupferatome im aktiven Zentrum des Enzyms O₂ binden. In dieser oxygenierten Form kann das Enzym sowohl ein Diphenol binden und zu einem Chinon oxidieren, als auch ein Monophenol binden, um ein ortho-Diphenol zu bilden. Wenn ein Diphenol gebunden wurde, liegt das Enzym anschließend in einer met-Form vor. Diese Konfiguration ist ebenfalls in der Lage, ein ortho-Diphenol in ein Chinon zu überführen. Das Enzym liegt dann wieder in der deoxygenierten Form vor, und es muß wieder O₂ gebunden werden, bevor es wieder katalytisch aktiv werden kann. Die lag-Phase der Monophenolasereaktion liegt darin begründet, dass zunächst das Protein auch in der met-Form vorliegt und in die oxy-Form

überführt werden muß, um die Monophenolasereaktion zu katalysieren. Nach Solomon et al. (1996) liegen die PPOs sogar hauptsächlich in der met-Form vor.

Bereits Kahn und Pommerantz (1980) beschrieben, dass die lag-Phase zu Beginn der Monophenolasereaktion sich verkürzt, wenn Ascorbat zum Reaktionsansatz zugegeben wird. Durch das Ascorbat werden die entstandenen Diphenole stabilisiert, und so wird verhindert, dass sie von den PPOs zu den entsprechenden Chinonen weiteroxidiert werden. Dadurch katalysieren die PPOs nach der Überführung in die oxy-Form nur noch die Monophenolasereaktion und eine Diphenolasereaktion wird unterbunden.

4.4 Bestimmung des apparenten K_m -Wert für p-Cumarsäure

Die Bestimmung des apparenten K_m -Werts für das Substrat p-Cumarsäure ergab mit 101 μM für die PPOs aus der nicht-transgenen Kultur und für PPOs aus der transgenen Kultur mit 46 μM recht niedrige K_m -Werte. Dies deutet auf eine hohe Affinität des Enzyms hin.

Mazzafera und Robinson (2000) wiesen für die Substrate Tyrosin und p-Cumarsäure keinerlei Enzymaktivität bei PPOs aus Blättern und Endosperm von *Coffea arabica* nach. Die ermittelten K_m -Werte für das Substrat Chlorogensäure lagen jedoch mit 880 μM für PPOs aus den Blättern und 2,27 mM für die PPOs aus dem Endosperm deutlich über den K_m -Werten, die im Rahmen dieser Arbeit für p-Cumarsäure ermittelt wurden. Vaughan und Butt (1969) wiesen bei Verwendung von p-Cumarsäure eine Monohydroxylaseaktivität in Proteinextrakten aus *Beta vulgaris L.* nach. Kahn und Pommerantz (1980) ermittelten für D- und L-Tyrosin einen K_m -Wert von 2 mM für PPOs aus Avocadofrüchten. Für die Monophenole Tyramin und p-Cresol bestimmten Kahn und Pommerantz 550 μM und 650 μM . Fenoll et al. (2002) bestimmten für 4-Hydroxyanisol einen K_m -Wert von 80 μM und für Tyramin von 510 μM , allerdings für Tyrosinasen aus Muscheln. Die Tyrosinasen sind tierische Enzyme, die mit pflanzlichen PPOs verwandt sind. Auffallend ist die Übereinstimmung der K_m -Werte für Tyramin bei Kahn und Pommerantz 550 μM und Fenoll et al. 510 μM . Fenoll et al. untersuchten mehrere Monophenole und Diphenole, wobei sich herausstellte, dass für die Diphenole meist ein höherer K_m -Wert bestimmt wurde als für Monophenole. Die gleiche Beobachtung machten auch Kahn und Pommerantz bei den Avocado-PPOs. Steiner et al. (1999) ermittelten für Tyrosin einen K_m -Wert von 1 mM. Golbeck und Cammarata (1980) bestimmten für Dopamin einen K_m -Wert von 740 μM , für Dihydroxyphenylalanin (DOPA) einen K_m -Wert von 8,3 mM und für Kaffeesäure von 40,8 mM. Die ermittelten K_m -Werte weisen auf sehr schwache Bindungen zwischen dem Enzym und dem Substrat hin. Gomez-Lopez (2002) untersuchte PPOs aus zwei Avocado Varietäten und bestimmte die K_m -Werte für diverse Substrate. Die niedrigsten K_m -Werte bestimmte er für Kaffeesäure mit 110 μM beziehungsweise 250 μM . Für die Chlorogensäure ermittelte er 370 μM und 340 μM . Dagegen bestimmte er für DOPA einen K_m -Wert von 11,3 mM und 9,88 mM.

Beim Vergleich der gefundenen Werte untereinander ergeben sich zum Teil größere Diskrepanzen. Das Problem könnte darin bestehen, dass die K_m -Werte alle mit Proteinrohextrakten oder nur mit angereinigten Proteinextrakten bestimmt wurden. Zum Teil wurden die Extrakte aus Blättern oder Fruchtfleisch gewonnen und können daher unterschiedliche PPO-Isoformen enthalten, die wiederum unterschiedlich starke Bindungen zum Substrat ausbilden oder auch unterschiedliche Substratspezifitäten haben.

4.5 Substratspezifität der PPOs

Die Substratspezifität der untersuchten Monophenolasen ist nicht sehr ausgeprägt. Es wurden neben der p-Cumarsäure noch p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat (pC-DHPL) und 4-Hydroxyphenyllactat (HPL) als Substrate akzeptiert und zu den entsprechenden Dihydroxyverbindungen umgesetzt. Eine sehr geringe Aktivität war noch gegenüber p-Cumarylchinasäure (pC-China) zu beobachten. Keinerlei Reaktionsprodukte konnten bei Verwendung von Tyrosin, 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) und 4-Hydroxybenzoesäure (HB) detektiert werden.

Beide PPO-Isoformen unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Substrate, die sie akzeptieren. Die saure Isoform könnte eine etwas geringere Substratspezifität aufweisen als die neutrale Isoform, jedoch sind die Versuchsansätze mangels einzelner Substrate zu gering, um eine definitive Aussage zu machen. Die Größe der Substituenten an der Seitenkette scheint jedoch keinen entscheidenden Einfluß darauf zu haben, ob das Molekül als Substrat akzeptiert wird. Die Gründe müssen daher in den Ladungen begründet liegen, die die Substituenten tragen und mit denen sie mit den Aminosäuren in der Binderegion des Enzyms in Wechselwirkung treten. Da dadurch eine Verbindung zum Enzym-Substrat-Komplex verhindert oder eine Bindung in einem nicht exaktem Winkel (Solomon et al., 1996; Decker und Tuczek, 2000) erfolgen kann, wäre dadurch eine Hydroxylierung am phenolischem Ring in ortho-Position nicht mehr möglich.

Mazzafera und Robinson (2000) überprüften ebenfalls die Substratspezifität der PPOs aus Blättern und Endosperm von *Coffea arabica*. Es wurde weder Tyrosin noch p-Cumarsäure umgesetzt. Die Diphenolaseaktivitäten der PPOs gegenüber den Substraten waren allerdings auch sehr unterschiedlich. Dihydroxyphenylalanin (DOPA) wurde nur von PPOs des Endosperm in sehr geringem Maße umgesetzt, im Vergleich zur als Referenz verwendeten Chlorogensäure. Dincer et al. (2002) untersuchten ebenfalls die Diphenolasereaktion und zeigten, dass Catechol und DOPA nur noch 68% beziehungsweise 59% der relativen Aktivität im Vergleich zu 4-Methylcatechol haben. Wenn Epicatechin als Substrat verwendet wurde, ergab sich noch eine relative Aktivität von 47% und nur Dihydroxyphenylpropionsäure wurde als Substrat kaum akzeptiert. Steiner et al. (1999) wiesen eine Tyrosinase aus Kalluskulturen von *Portulacca grandiflora* nach, die Tyrosin zu DOPA umsetzt, aber p-Cumarsäure nicht zu Kaffeesäure. Wenn sie allerdings aus Wurzeln von *Portulacca grandiflora* Tyrosinase extrahierten, war diese in der Lage, p-Cumarsäure zu Kaffeesäure umzusetzen, Tyrosin zu DOPA allerdings nur noch in sehr geringem Maße. Steiner et al. zeigten ferner, dass weder die Tyrosinase aus den Kalluskulturen noch die aus den Wurzeln 4-Hydroxybenzoesäure hydroxylieren konnte. Dieser Befund deckt sich mit der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung, bei der 4-Hydroxybenzoesäure nicht umgesetzt wurde. Fenoll et al. (2002) stellten ebenfalls fest das Tyrosinasen aus Muscheln diverse Monophenole und Diphenole zu den entsprechenden Diphenolen und Chinonen umsetzen können (siehe auch 4.4).

Es scheint generell, dass PPOs keine hohe Selektivität gegenüber ihren möglichen Substraten haben, die im Rahmen der Mono- und Diphenolasereaktion umgesetzt werden. Wenn K_m -Werte für die entsprechenden Substrate bestimmt wurden, weisen diese meist auch eine sehr geringe Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes auf. Dies kann auch ein Hinweis auf recht geringe Substratspezifitäten der PPOs sein. Allerdings ist ein Problem, dass Proteinextrakte

untersucht werden, in denen mehrere PPO-Isoformen vorliegen. Daher könnte es auch sein, dass die einzelnen PPO-Isoformen leicht unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen.

4.6 Hemmung der Monophenolaseaktivität

Die Monophenolaseaktivität ist durch DTT und DIECA hemmbar. EDTA fördert die enzymatische Aktivität der Monophenolasen. DTT verhindert das Ausbilden von Disulfidbrückenbindungen und könnte so den katalytischen Zyklus der PPOs unterbrechen und hemmend wirken, andererseits wiesen Johannes und Majcherczyk (2000) darauf hin, dass DTT auch stabile Komplexe mit Kupfer bilden kann. Daher könnte DTT auch am Cu im aktiven Zentrum binden und so hemmend wirken. DIECA kann Cu ebenfalls komplexieren und inaktiviert so die Monophenolasen, die zwei Cu in ihrem aktiven Zentrum besitzen. An das Kupfer A (Decker und Tuczec, 2000) binden die Monophenole an und die Hydroxlierungsreaktion kann durchgeführt werden. Decker und Tuczec (2000) wiesen auch darauf hin, dass durch Abschirmung des Cu A durch einen bestimmten Phenylalaninrest das aktive Zentrum der PPOs nicht mehr in der Lage ist, eine Monophenolaseaktivität auszuüben, da die Monophenole nicht mehr an das entsprechende Kupfer binden können. Diese Abschirmung des Cu A, die durch Detergentien bei der Proteinextraktion hervorgerufen werden könnte, könnte der Grund sein, weshalb oft keine Monophenolaseaktivität mehr bestimmt werden kann. Der auf die Enzymreaktion fördernde Einfluß von EDTA kann auf die Eigenschaft als Chelator für 2-wertige Ionen zurückgeführt werden. EDTA könnte Metallionen die in der Lösung frei diffundieren abfangen und so die enzymatische Umsetzung fördern, da Metallionen die im Enzymtestansatz vorliegende Ascorbinsäure zersetzen (Römpp, 1995).

Tropolon ist ein Hemmstoff (Kahn und Andrawis, 1985) für Tyrosinasen aus Muscheln. Tyrosinasen sind eng verwandte Enzyme der pflanzlichen Phenolase und sind an der Melaninbildung beteiligt (Decker und Tuczec, 2000; Steffens et al., 1994). Tropolonderivate kommen in der Natur selten vor. Die Thujaplicine (Römpp, 1995) aus *Thuja plicata*, der roten Zeder, sind in erster Linie im Kernholz lokalisiert und bilden dort mit Eisen einen roten Komplex, der für die charakteristische Färbung verantwortlich ist. Sie haben fungizide Wirkung. Ein weiteres Tropolonderivat ist das Colchicin aus der Herbstzeitlose, welches ein starkes Mitosegift ist. Es fixiert die Mitose in der Metaphase. Angewendet wird es in der Pflanzenzüchtung um Polyploidien hervorzurufen.

Tropolon zeigt eine starke Hemmwirkung auf die Monophenolase aus den Tomatenkulturen. Diese starke Hemmwirkung wurde auch bei Tyrosinasen aus Muscheln beschrieben (Kahn und Andrawis, 1985). Der Hemmmechanismus wurde bei den Tyrosinasen als Mischhemmung beschrieben, der durch Zugabe von Kupfersulfat zum Reaktionsansatz zu 70% der Ausgangsaktivität reversibel ist. Ebenfalls kann die Hemmwirkung des Tropolon durch Zugabe von Fe^{2+} -Ionen zum Reaktionsansatz aufgehoben werden (Mizutani et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies für die untersuchten PPOs nicht überprüft werden, da durch Zugabe von Kupfer zum Reaktionsansatz die darin befindliche Ascorbinsäure zersetzt wird (Römpp, 1995) und das Testsystem nicht mehr funktioniert, da die entstehende Kaffeesäure zum entsprechenden Chinon oxidiert wird. Daher wurde bei Zugabe von Kupfersulfat zum Enzymtest kein Produkt detektiert.

Bei den durchgeführten Versuchen mit PPOs aus den Tomatenkulturen konnte eine Hemmung der PPOs aus beiden Kulturen durch Tropolon nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Espin et al. (1997 c). Sie konnten ebenfalls PPOs aus Artischocken durch Zugabe von Tropolon zum Reaktionsansatz hemmen. Shin et al. (1997) konnten durch Tropolon die Enzymaktivität bei PPOs aus Blättern von *Vigna radiata*, die nur noch die Diphenolasereaktion katalysierten, nur noch zu 42% hemmen. Der Hemmtyp, der bei Kahn und Andrawis (1985) als Mischhemmung beschrieben wurde, lässt sich anhand der Ergebnisse für die PPOs aus beiden Kulturen bestätigen. Kahn und Andrawis (1985) beschrieben, dass das Tropolon an Kupfer binden kann, welches sich im aktiven Zentrum von Tyrosinasen, Phenolasen etc. befindet, so dass eigentlich eine rein kompetitive Hemmung zu erwarten wäre.

4.7 Proteinreinigung

4.7 1 Proteinreinigung der Polyphenoloxidasen aus Tomatenzellkulturen

Durch die Anionenaustauschchromatographie über Q-Sepharose wurden zwei PPO-Isoformen voneinander getrennt. Bei der Bestimmung des pH-Optimums der PPOs im Proteinextrakt nach einer Ammoniumsulfatfällung wurde bereits festgestellt, dass es zwei Optima bei pH 4,5 und pH 7,5 gibt. Die Enzymaktivitäten bei den beiden pH-Werten konnten schließlich durch eine Anionenaustauschchromatographie über Q-Sepharose voneinander getrennt werden und jeweils einer Isoform zugeordnet werden.

Bei den beschriebenen Bedingungen eluierte die PPO-Isoform, die bei einem pH-Wert von 7,5 ihre maximale Monophenolaseaktivität entfaltet, sofort, während die „saure Isoform“, die bei einem pH von 4,5 ihre maximale Monophenolaseaktivität entfaltet, sich erst nach Salzzugabe von der Säulenmatrix ablöst.

Bei der weiteren Reinigung der sauren Isoform über Hydroxylapatit ist schließlich auch keine Monophenolaseaktivität mehr bei einem pH-Wert von 7,5 messbar. Dies deutet daraufhin, dass die pH-Optima je einer Isoform zuzuordnen sind. Die „saure Isoform“ übt ihre Monophenolaseaktivität im Säuren aus und die „neutrale Isoform“ bei entsprechend neutralen pH-Werten.

Es ist allerdings anzunehmen, dass es mehr als nur diese zwei PPO-Isoformen in der nicht-transgenen Tomatenzelllinie gibt, da in den Fraktionen der „neutralen Isoform“, die bereits über Hydroxylapatit gereinigt wurden, noch eine Enzymaktivität bei einem pH-Wert von 4,5 messbar ist. Die Kurvenverläufe der Enzymaktivitäten in den Fraktionen der Hydroxylapatitchromatographie lassen sich hinsichtlich ihrer Profile zueinander nicht miteinander in Deckung bringen, was für unterschiedliche Isoformen sprechen kann. Des weiteren deuten die unterschiedlichen Reinigungsfaktoren darauf hin, die sich ergeben, wenn man die Reinigungsfaktoren, die durch die Hydroxylapatit-Chromatographie erreicht werden, miteinander vergleicht. Es ergab sich für die „neutrale Isoform“ insgesamt ein Reinigungsfaktor von 5983. Wenn nun der Reinigungsfaktor für diese neutrale Isoform nach der Q-Sepharose gleich 1 gesetzt wird, und man den letzten Reinigungsschritt für sich betrachtet, ergibt sich ein Reinigungsfaktor von 5,8. Wenn nun für die identischen Fraktionen die Enzymaktivitäten bei ei-

nem pH-Wert von 4,5 betrachtet werden und der Reinigungsfaktor für diesen Schritt ermittelt wird, ergibt sich ein Reinigungsfaktor von 31. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man einer Isoform ein pH-Optimum zuordnen. Dies muß nicht bedeuten, das es nur zwei Isoformen gibt. Es läßt sich mit diesen Daten von mindestens zwei Isoformen sprechen und, wie oben ausgeführt, kann es noch weitere geben. Es könnte vermutet werden, dass es zumindest bei der „neutralen Isoform“ während der ersten Chromatographie zu einer Verunreinigung kommen kann durch Protein der „sauren Isoform“, das nicht an die Säulenmatrix gebunden hat. Dies kann nicht völlig ausgeschlossen werden, jedoch waren die Elutionsprofile über mehrere Läufe konstant, auch mit geringeren Proteinmengen, so dass eine Absättigung der Säulenmatrix ausgeschlossen werden kann.

Auf dem SDS-Polyacrylamidgel sind in der partiell gereinigten Fraktion der „sauren Isoform“ zwei Proteinbanden mit Molekülmassen von 78 kDa und 60 kDa zu erkennen. Bei der „neutralen Isoform“ sind noch 3 Proteinbanden mit Molekülmassen von 78 kDa, 60 kDa und 52 kDa zu erkennen.

In der Literatur existieren sehr unterschiedliche Angaben zu den Molekülmassen der PPOs. Steffens et al. (1994) beschrieben, dass es sich bei den Molekülmassangaben der PPOs in erster Linie um drei Massenbereiche handelt von 70-72 kDa, 59-62 kDa und 40-45 kDa. Die Isoformen mit Molekülmassen über 70 kDa werden als Vorläuferproteine angesehen, von denen ein circa 11 kDa großes Proteinfragment als Signalpeptid dient. Dieses Signalpeptid soll die Information für einen Transport der kernkodierte PPOs ins Thylakoidlumen tragen. Dies wurde über Sequenzvergleich von cDNAs potentieller Transitpeptide ermittelt.

Raymond et al. (1993) fanden in Sonnenblumensamen, PPOs mit einer Molekülmasse von 42 kDa nach einer SDS-PAGE. Nach einer Gelfiltration ermittelten sie eine Masse von 49 kDa. Raymond et al. vermuteten, dass die Differenz der beiden Ergebnisse durch eine Abspaltung einer Zuckerkette zustande kommen könnte. Sie vermuteten, dass diese PPOs Glykoproteine sein könnten. Die teilweise gereinigten PPOs zeigten allerdings nur noch Diphenolaseaktivität und keine Monophenolaseaktivität mehr.

Für die aus insgesamt sieben Genen bestehende Genfamilie der Tomate wurde ein Vorläuferprotein der Größe zwischen 66 und 71 kDa und eine Molekülmasse von 57 – 62 kDa für die „reifen“ PPOs errechnet.

Eine vergleichbare Molekülmasse lässt sich auch in der durchgeführten SDS-Gelelektrophorese wiederfinden, wo bei beiden Isoformen eine Proteinbande mit einer Masse von ca. 60 kDa zu erkennen ist. Die ebenfalls bei beiden Isoformen vorkommende Proteinbande mit einer Masse von 78 kDa könnte möglicherweise einem „unreifen“ Vorläuferprotein zuzuordnen sein.

Sokolenko et al. (1995) errechneten für eine cDNA ein 64 kDa großes Protein aus Spinatblättern. Ein Sequenzvergleich der cDNA ergab eine hohe Homologie zum PPO A Gen aus der Tomate. Des weiteren enthielt die cDNA eine Sequenz für ein Signalpeptid, das typisch ist für einen Transport ins Thylakoidlumen. Lax und Vaughn (1991) fanden in Thylakoidmembranfraktionen von *Vicia faba* PPOs gemeinsam mit Proteinen des Photosystems II. Sommer et al. (1994) zeigten, dass von einer PPO mit einer Größe von 67 kDa zunächst beim

Transport ins Stroma ein 5 kDa großes Stück abgetrennt wird und dann nach weiterem Transport im Thylakoidlumen nur noch ein 59 kDa großes Protein zu finden ist.

4.7.2 Diphenolaseaktivität

Die Diphenolaseaktivität wurde in den Extrakten photometrisch (Shin et al., 1997) über die Bildung von Dopachinon bestimmt. Die Diphenolaseaktivität der PPO-Isoformen in den Proteinextrakten ist nach der Reinigung über Q-Sepharose deutlich gesteigert, allerdings nach der Reinigung über Hydroxylapatit teilweise wieder gesunken. Die Fraktionen weisen dennoch eine gesteigerte Diphenolaseaktivität auf, wie auch eine gesteigerte Monophenolaseaktivität. Da die Diphenolaseaktivität photometrisch über die sich bildenden Polyphenole gemessen wurde, sind diese Ergebnisse allerdings stärkeren Schwankungen unterworfen als die bei der Bestimmung der Monophenolaseaktivität, wo direkt das gebildete Produkt über HPLC quantifiziert wurde. Die Abnahme der Diphenolaseaktivität nach einer Chromatographie über Hydroxylapatit beobachteten auch Shin et al. (1997) bei PPOs aus *Vigna radiata* Blättern.

4.7.3 RT-PCR

Die gewählten Primer PS2 und PPOas hybridisieren im *Lycopersicon esculentum* Genom innerhalb der PPO-Gen-Sequenz; die Homologien der Primersequenzen wurden über die EMBL-Gendatenbank überprüft. Es ergaben sich ausschließlich Homologien zu PPO-Gensequenzen. Die Homologiesequenzen wurden außerhalb der Cu-Binderegionen ausgesucht, ab Position 555 für den Primer PS2 und ab Position 1370 für den Primer PPOas (Newman et al., 1993). Für das PCR-Produkt ergibt sich somit theoretisch eine Länge von 844 bp. Die im Agarose-Gel bestimmten Längen der PCR-Produkte von circa 800-850 bp entsprechen somit genau der zu erwartenden Länge. Es konnte damit gezeigt werden, dass am siebten Tag der Kulturperiode in den beiden Tomatenzelllinien PPO-m-RNA transkribiert wird. Daher kann auch davon ausgegangen werden, dass auch PPOs in den Tomatenzellen zu diesem Zeitpunkt synthetisiert werden.

4.8 Charakterisierung der beiden Tomatenzelllinien

Die Charakterisierung der Suspensionskulturen der beiden Tomatenzelllinien wurde über eine Kulturperiode von 13 Tagen durchgeführt. Das Wachstum der beiden Kulturen weist nur leichte Unterschiede auf. Die Zunahme des Trockengewichts (TG) in der transgenen Kultur (S. 37 Abb. 11) ist geringfügig höher als in der nicht-transgenen Kultur (Abb. 10) und erreicht auch bereits nach 5 Kulturtagen ihr Maximum, während die nicht-transgene Kultur dieses erst einen Tag später erreicht. Die Kurve für die Biomassezunahme zeigt für die nicht-transgene Kultur zunächst eine Abnahme und dann erst eine stetige Zunahme.

Die Entwicklung des Frischgewichts dagegen verläuft bei beiden Kulturen recht identisch. Beide erreichen am 7 Tag der Kulturperiode ihr Maximum bei 16 g Frischgewicht pro Kolben. Da die nicht-transgene Kultur allerdings weniger Trockenmasse produziert hat, bedeutet dies, dass die Zellen größer sind und einen höheren Wasseranteil aufweisen als die Zellen der

transgenen Kultur. Bei beiden Kulturen setzt ab dem 7. Tag der Kulturperiode die Absterbephase ein, in der vermehrt Zellen lysieren.

4.8.1 Veränderung der Kulturmedien

In den Kulturmedien der beiden Kulturen wurde die Entwicklung des Zuckergehalts, der Leitfähigkeit und des pH-Werts über die Kulturperiode verfolgt. Der pH-Wert zeigt bei beiden Kulturen keine starken Veränderungen über die Kulturperiode hinweg. Es ist bei beiden Kulturen zu beobachten, dass er allmählich ansteigt.

Die Veränderung des Zuckergehalts im Medium gibt Aufschluss darüber, wie schnell die Kohlenstoffquelle im Medium von den Zellen verbraucht wird und gibt somit Auskunft über das Wachstum der Kultur. Bei der transgenen Kultur ist eine schnellere Abnahme des Zuckergehalts (S.39 Abb. 13) als bei der nicht-transgenen Kultur zu beobachten. Der erhöhte Verbrauch der transgenen Kultur läßt auf ein schnelleres Wachstum und eine schnellere Biomassenzunahme schließen, die auch durch die Entwicklung der Trockengewichtskurve belegt wird. Es ist beim Zuckerverbrauch der transgenen Kultur zu beobachten, dass die Abnahme bis zum 5. Tag sehr schnell geschieht und danach noch bis zum 7. Tag sehr langsam. Dies spiegelt sich auch in den Wachstumskurven der transgenen Kultur (S. 37 Abb. 11) wieder. Ab dem 5. Tag ist kaum noch Zucker im Medium, daher wird kaum noch weitere Biomasse produziert und die Zellvermehrung stagniert. Allerdings nimmt das Frischgewicht weiter bis zum 7. Tag zu. Von da an sind die Reserven erschöpft, und die Kultur geht in die Absterbephase über.

Bei der nicht-transgenen Kultur verläuft die Entwicklung ähnlich, jedoch um einen Tag verzögert ab. Die lag-Phase der Kultur zu Beginn ist deutlich stärker ausgeprägt als bei der transgenen Kultur. Bei der nicht-transgenen Kultur wird erst ab dem 2. Kulturtag (S. 39 Abb. 13) Zucker aus dem Medium verbraucht, bis sich der Zuckervorrat am 6. Tag im Medium nahezu erschöpft hat. Das Wachstum der nicht-transgenen Kultur verläuft langsamer als das der transgenen Kultur.

Die Entwicklung der Leitfähigkeit des Mediums gibt Aufschluss darüber, in welchem Maße Ionen aus dem Medium in die Zellen aufgenommen und verbraucht werden (S.39 Abb.14). Bei beiden Kulturen beginnt sofort am Anfang der Kulturperiode eine Ionenaufnahme aus dem Medium in die Zellen. Der Verlauf der Leitfähigkeit ist bei beiden Kulturen sehr ähnlich und lässt keine deutlichen Unterschiede erkennen. Ab dem 7. Tag findet keine weitere Aufnahme mehr statt. Von da an ist wieder eine Zunahme der Leitfähigkeit im Medium zu beobachten, was für eine Abgabe von Ionen ins Medium spricht. Diese Abgabe ins Medium kommt durch die vermehrte Zelllyse in der nun einsetzenden Absterbephase der Kulturen zustande. Diese einsetzende Absterbephase wird auch durch die Wachstumskurven belegt.

4.8.2 Monophenolaseaktivität im Kulturverlauf

Die Monophenolaseaktivität wurde in beiden Kulturen über die Kulturperiode von 13 Tagen beobachtet (s.a. Kapitel 3.2.3 S.40 ff). Dabei wurden aus beiden Kulturen mit

Ammoniumsulfat gefälltes Protein für die Enzymtests verwendet. Die Enzymtests wurden immer am gleichen Tag bei den beiden pH-Werten 4,5 und 7,5 durchgeführt, an dem auch der Proteinextrakt gewonnen wurde.

Es wurde beobachtet, dass bei pH 7,5 erst ab dem 6. Tag eine Monophenolaseaktivität im Extrakt der nicht-transgenen Kultur zu messen war, während die Isoform, die bei einem sauren pH-Wert ihre maximale Enzymaktivität entfaltet, bereits zu Beginn der Kulturperiode aktiv ist. In der transgenen Kultur ist während der gesamten Kulturperiode kaum eine Enzymaktivität bei einem pH-Wert von 7,5 zu bestimmen.

Da die Enzymaktivitäten bei beiden pH-Werten je einer anderen PPO-Isoform zuzuordnen ist, ist davon auszugehen, dass die Gene der PPO-Isoform, die bei pH 7,5 (neutrale Isoform) aktiv ist, erst zu einem sehr späten Zeitpunkt in der Kulturperiode exprimiert werden.

Auffällig ist bei beiden Kulturen, dass ab dem 5./6. Tag eine Abnahme der Enzymaktivität bei pH 4,5 stattfindet. Zu diesem Zeitpunkt setzt in der nicht-transgenen Kultur die Aktivität der „neutralen Isoform“ ein. Es scheint nicht zufällig zu sein, dass genau zu diesem Zeitpunkt der Kulturperiode eine Veränderung der beiden Enzymaktivitäten stattfindet, da dies auch der Zeitpunkt ist, an dem die Kulturen von der Wachstumsphase in die stationäre Wachstumsphase und dann in die Absterbephase übergehen.

Die Wachstumskurven belegen, dass die Kulturen in die stationäre Phase übergehen und es nur noch zu einem Zellwachstum kommt, aber nicht mehr zu einer Zellvermehrung. Dies ist bedingt durch die beginnende Erschöpfung der Kohlenstoffquelle im Medium. Diese Nährstoffknappheit und der dadurch hervorgerufene Stress könnte die Ursache für die veränderten Enzymaktivitäten der beiden Isoformen sein.

4.9 Rolle der PPOs in Pflanzen

Die Rolle der PPOs in Pflanzen ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Es wurde vermutet, dass sie eine Rolle im Rahmen des Phenylpropanstoffwechsels spielen könnten, in der Pathogenabwehr oder beim Elektronentransport. Eine Bedeutung im Rahmen des Phenylpropanstoffwechsels dürften die PPOs in Pflanzen nicht haben. Franke et al. (2002) gelang es eine membranständige 3-Hydroxylase in *Arabidopsis thaliana* nachzuweisen, die p-Cumarsäure, p-Cumarylaldehyd und p-Cumarylmethylester in die entsprechenden Dihydroxyverbindungen umsetzen kann. Diese Cytochrom-P450 abhängige Hydroxylase wies zwar sehr geringe Enzymaktivitäten auf, dies könnte allerdings nach Franke et al. über einen Kanalisierungseffekt kompensiert werden. Dabei wären die Zimtsäure 4-Hydroxylase und die 3-Hydroxylase in einem Enzymkomplex angeordnet. Auf diese Weise wäre die lokale Substratkonzentration sehr hoch und eine ausreichende enzymatische Umsetzung der Substrate wäre gewährleistet. Dementsprechend wäre eine Beteiligung der PPOs an der Bereitstellung der Monolignole für die Lignifizierung unwahrscheinlich. Des Weiteren sind die Substratspezifitäten der PPOs nicht besonders ausgeprägt, wie es auch in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Allerdings ist es nicht auszuschließen, dass in einzelnen Pflanzenspezies rudimentäre zweite Phenylpropanwege existieren (Dixon et al., 2001) die phenolische Substanzen, beispielsweise für die Pathogenabwehr (Pearce et al., 1998), produzieren. Steiner et al. (1999) postulierten

eine Beteiligung einer Tyrosinase an der Betalainsynthese, bei der Umsetzung von Tyrosin über DOPA zu Dopachinon. Rompel et al. (1999 a/b) und Eicken et al. (1998) wiesen in *Lycopus europeus*, *Populus nigra* und *Ipomoea batatas* Katecholasen nach, die keinerlei Monophenolaseaktivität mehr aufwiesen. Ebenso wie Raymond et al. (1993), die aus Sonnenblumensamen PPOs isolierten, die nur noch eine Diphenolaseaktivität (Katecholoxidaseaktivität) aufwiesen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Monophenolaseaktivität als auch eine Diphenolaseaktivität in den gereinigten Proteinextrakten bestimmt werden konnten, wobei die Diphenolaseaktivität nach dem letzten Reinigungsschritt über Hydroxylapatit deutlich abnahm im Gegensatz zur extrem gesteigerten Monophenolaseaktivität. Dies steht im Gegensatz zu den zitierten Ergebnissen. Dies könnte bedeuten, dass die Mono- und Diphenolaseaktivitäten durch unterschiedliche PPO-Isoformen katalysiert werden. Möglicherweise handelt es sich auch um Artefakte, die im Zusammenhang mit der Proteinreinigung und Isolierung entstehen. Decker und Tuczec (2000) zeigten, dass es nur des Austauschs eines Phenylalaninrests bedarf, um eine Monophenolaseaktivität zu unterbinden, da durch den Austausch das Kupfer A im aktiven Zentrum nicht mehr für das Substrat erreichbar ist (siehe auch 4.6).

Dass PPOs eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen (Bachem et al. 1994; Li und Steffens; 2002), ist mittlerweile hinreichend belegt.

Thipyapong et al. (1997 b) wiesen nach, dass die Expression der einzelnen PPO-Gene in *Lycopersicon esculentum* zu unterschiedlichen Entwicklungsphasen der Pflanze erfolgt. Des Weiteren stellten Thipyapong et al. (1997 a) fest, dass das PPO-Gen F bei mechanischer Verletzung oder Infektion eine gesteigerte Expression aufwies, die Gene A-E zeigten allerdings keine veränderte Expression. Welche Rolle die Genprodukte dieser Gene in der Tomate spielen, ist unklar. Die Ergebnisse zeigten aber starke Unterschiede in der Expression der Gene bezüglich des Entwicklungsstadiums der Pflanze, wobei die Zusammenhänge mit den unterschiedlichen PPO-Isoformen noch nicht geklärt sind. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass die PPOs in unterschiedlichen Pflanzenfamilien, und zum Teil auch innerhalb einer Familie, weitere Unterschiede im Bezug auf ihre Aktivierung aufweisen. Constabel et al. (1995) zeigten eine PPO-Aktivierung über das Systemin-System in Tomatenblättern. Bei einer Beschädigung der Tomatenpflanze durch einen Herbivore wird zunächst Prosystemin, ein ungefähr 200 Aminosäuren umfassendes Polypeptid, freigesetzt und in Systemin proteolytisch gespalten (Richter, 1996). Das Systemin stellt ein 18 Aminosäuren großes Peptidhormon dar, welches an einen Rezeptor im Plasmalemma bindet und eine Kaskade aktiviert, die schließlich zur Bildung von Jasmonsäure führt. Die Jasmonsäure induziert dann die Expression von Proteinaseinhibitoren. Durch dieses System wird eine Abwehrreaktion nicht nur in der Nähe der Verletzung ausgelöst, sondern in der gesamten Pflanze. Die Abwehrreaktion ließ sich auch durch Zugabe von Methyljasmonat induzieren. Ferner wiesen Constabel und Ryan (1998) nach, dass sich PPOs in erster Linie nur in der Familie der Solanaceae, außer *Capsicum annuum*, durch Methyljasmonat induzieren ließen. In den anderen untersuchten Nahrungspflanzen konnten die PPOs in den Blattextrakten nicht induziert werden. Gooding et al. (2001) zeigten ebenfalls, dass PPOs aus Bananenfrüchten sich nicht durch Methyljasmonat induzieren ließen.

Tolbert (1973) wiederum stellte fest, dass die Aktivität der PPOs aus *Spinacia oleracea* durch Licht beeinflussbar ist, wie auch Bolwell und Butt (1983). Steffens et al. (1994) fassten weitere Befunde zusammen, wie PPOs aktiviert werden, wobei einige möglicherweise durch

die Aufarbeitung der Proteinextrakte bedingt sein können. Häufig sind PPOs erst nach einer limitierten Proteolyse durch Proteasen aktiv, andere wiederum verlieren ihre Aktivität. Diese Befunde weisen jedoch alle auf ein hochreguliertes komplexes System hin, das sowohl auf der Ebene der Expression als auch auf Proteinebene reguliert ist. Daher ist es durchaus möglich, dass die „neutrale Isoform“ in den Zellkulturen von *Lycopersicon esculentum* erst zu einem sehr späten Zeitpunkt exprimiert oder auf Proteinebene aktiviert wird. In der transgenen Kultur konnte die „neutrale Isoform“ nicht detektiert werden.

Thipyapong et al. (1997 a) weisen darauf hin, dass sie in der transgenen Tomatenpflanze die Expression aller PPO-Gene stark reprimiert haben und die daraus resultierenden Tomatenpflanzen überempfindlich sind gegenüber Pathogenattacken. In dieser Arbeit belegen sie ferner die Bedeutung des PPO-Gens F für eine induzierte Abwehrreaktion in der Tomate. Constable et al. (1995) wiesen den Zusammenhang zwischen der Pathogenattacke durch eine Verletzung und dem Systemin-System und der daraus resultierenden gesteigerten PPO-Aktivität nach. Die N-terminale Sequenz eines beteiligten Proteins war identisch mit der übersetzten N-terminalen Sequenz des PPO F-Gens. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der neutralen PPO-Isoform, die aus der nicht-transgenen Kultur isoliert werden konnte und dem Protein von Constable et al.. Da nur ein Gen an der Abwehrreaktion über das Systemin-System beteiligt ist (Thipyapong et al., 1997 a) und eben jene neutrale Isoform in der transgenen Tomatenzelllinie nicht vorkommt, die hypersensitiv gegenüber Pathogenattacken ist, könnte diese Isoform eine Rolle spielen. Überprüft werden könnte dies, indem Elicitierungsversuche mit Methyljasmonat durchgeführt werden und man beobachtet ob diese Isoform durch Elicitierung verstärkt gebildet wird oder eine deutlich gesteigerte Aktivität aufweist. Gleichzeitig könnte beobachtet werden, ob die saure Isoform auch durch Methyljasmonat elicitiert werden kann und eine Rolle in der Pathogenabwehr über das Systemin-System spielt. Wenn die saure Isoform durch Methyljasmonat nicht beeinflusst wird, könnte sie eine Rolle in einem anderen System zur Pathogenabwehr spielen oder sie übernimmt völlig andere Aufgaben.

Wie bereits im Rahmen der Isoformentrennung diskutiert wurde, wurden PPOs auch im Thylakoidlumen (Sommer et al., 1994) oder der Thylakoidmembran lokalisiert (Lax und Vaughn, 1991; Sokolenko et al., 1995) und dort mit dem Photosystem II in Verbindung gebracht. Es wurde ihnen eine mögliche Rolle in der Elektronentransportkette zugeschrieben, entweder strukturell oder funktionell.

Die Rolle der PPOs in Pflanzen lässt sich anscheinend nicht allgemeingültig über alle Pflanzenfamilien hinweg beantworten. Gesichert scheint die Erkenntnis, dass sie eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen, wobei diese Rolle sehr unterschiedlich sein kann, wie die Ausführungen zum Systemin-System zeigen. Dies scheint auch für eine mögliche Beteiligung an einem möglichen rudimentären zweiten Phenylpropanstoffwechsel zuzutreffen, der nur für eine oder auch einige Familien charakteristisch ist, wobei dieser dann auch bezüglich der Regulation in die Pathogenabwehr der Pflanze eingebunden sein kann. Da die Hinweise in den diversen Arbeiten deutlich auch auf eine Regulation der PPOs auf Proteinebene deuten, ist es unerlässlich, neben einer Studie der Genexpression auch die unterschiedlichen PPO-Isoformen zu trennen und zu charakterisieren, um diese mit einem oder mehreren Genen der Genfamilie in Verbindung zu bringen. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Berücksichti-

gung der Entwicklungsphase der Pflanze, wie es im Rahmen dieser Arbeit auch bei den Tomatenzellkulturen gezeigt werden konnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Phenylpropanstoffwechsel in zwei *Lycopersicon esculentum* Mill. Zelllinien durchgeführt. Eine der Zelllinien enthält ein Phenoloxidase (PPO)-Antisense-Konstrukt aus *Solanum tuberosum*, wodurch die Expression der PPO-Genfamilie herabgesetzt wurde (Thipyapong et al., 1997 b). Aus dieser und der genetisch nicht veränderten Zelllinie sollten Enzyme charakterisiert werden, die die Umsetzung der p-Cumarsäure zur Kaffeesäure katalysieren.

Es wurden zunächst die Gehalte einiger phenolischer Inhaltsstoffe der beiden Tomatenzelllinien bestimmt. In beiden Zelllinien liegen größere Mengen Chlorogensäure vor, ein charakteristischer phenolischer Inhaltsstoff von Tomaten. In der transgenen Zelllinie wurden 520 nmol/g TG und in der nicht-transgenen Zelllinie 278 nmol/g TG bestimmt. Die transgene Zelllinie enthält ebenfalls größere Mengen p-Cumarsäure (117 nmol/g TG) und Ferulasäure (60 nmol/g TG). In der nicht-transgenen Kultur ist keine p-Cumarsäure im methanolischen Extrakt zu detektieren, wohingegen die Menge an Ferulasäure (104 nmol/g TG) deutlich höher liegt als in der transgenen Kultur. Nach einer Glucosidase-Behandlung der Extrakte oder einer sauren Hydrolyse zeigte sich ebenfalls, dass in der nicht-transgenen Kultur mehr Ferulasäureverbindungen enthalten sind als in der transgenen Kultur, in der mehr p-Cumarsäureverbindungen vorliegen. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der verringerten Expression der PPOs in der transgenen Kultur und den geringeren Gehalten an Ferulasäureverbindungen.

Es wurde ein Enzymtest für PPOs etabliert, bei dem p-Cumarsäure als Substrat verwendet wurde. Es wurde die Zeitabhängigkeit der Monophenolasereaktion für eine Hydroxylierung von p-Cumarsäure zu Kaffeesäure ermittelt, der einen für die Monophenolasereaktion typischen sigmoiden Verlauf zeigte. Die Temperaturoptima für die Monophenolaseaktivität wurden bestimmt. Für die PPOs aus der transgenen Kultur wurde ein Optimum von 35°C ermittelt und für die PPOs aus der nicht-transgenen Kultur von 45°C. Für die PPOs aus der nicht-transgenen Kultur ergab sich ein apparenter K_m -Wert für p-Cumarsäure von 101 μM und für die PPOs aus der transgenen Kultur von 46 μM . Diese K_m -Werte zeigen, dass eine hohe Affinität zwischen dem Substrat und den PPOs besteht. Bei der Ermittlung des pH-Optimums ergab sich für die nicht-transgene Kultur ein Optimum bei pH 4,5 („saure Isoform“) und eine bei pH 7,5 („neutrale Isoform“). Diese pH-Optima ließen sich je einer PPO-Isoform zuordnen. In der transgenen Kultur konnte nur eine PPO-Isoform mit einem pH-Optimum von pH 4,5 ermittelt werden. Die PPOs ließen sich durch Tropolon hemmen. Bei 80 μM Tropolon im Reaktionsansatz sank die Monophenolaseaktivität auf 10%. Ebenfalls konnte die Monophenolasereaktion durch DTT und DIECA stark gehemmt werden, EDTA dagegen begünstigte die Reaktion. Die Substratspezifität für Monophenole wurde untersucht: neben p-Cumarsäure wurde auch p-Cumaryl-Dihydroxyphenyllactat, p-Cumarylchinasäure und 4-Hydroxyphenyllactat zu den entsprechenden Dihydroxyverbindungen umgesetzt. Die Substratspezifität der PPOs ist daher eher als gering einzustufen.

Im Rahmen einer Charakterisierung der beiden Tomatenzellkulturen wurde festgestellt, dass bis zum 5./6. Tag der Kulturperiode der Zucker im Medium verbraucht ist. Die Kulturen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der stationären Wachstumsphase und gehen langsam ab dem 7. Tag in die Absterbephase über. Dies wird auch durch die ermittelten Wachstumskur-

ven für Frischgewicht und Trockengewicht belegt, wie auch durch die Leitfähigkeit des Mediums. Die Monophenolaseaktivität im Kulturverlauf ergab, dass die „saure Isoform“ bereits zu Beginn der Kulturperiode aktiv ist, wohingegen die Monophenolaseaktivität der „neutralen Isoform“ erst gegen Ende der Kulturperiode, mit dem Beginn der Absterbephase der Kultur, auftritt.

Es gelang auch, die PPO-Isoformen zu trennen und partiell zu reinigen. Es konnten aus der nicht-transgenen Tomatenzelllinie zwei PPO-Isoformen isoliert und über Anionenaustauschchromatographie getrennt werden, die die Umsetzung von der p-Cumarsäure zur Kaffeesäure bei zwei verschiedenen pH-Werten katalysieren. Eine Isoform katalysierte diese Umsetzung bei einem pH-Wert von 4,5 („saure Isoform“) und die andere bei einem pH-Wert von 7,5 („neutrale Isoform“). In der transgenen Kultur wurde die saure Isoform aufgereinigt, die neutrale PPO-Isoform kommt in der transgenen Kultur nicht vor. Nach einer SDS-Gelelektrophorese sind in der Fraktion mit der angereinigten „sauren Isoform“ noch zwei Proteinbanden mit Molekülmassen von 78 kDa und 60 kDa zu erkennen und in der Fraktion mit der angereinigten „neutralen Isoform“ drei Proteinbanden mit Molekülmassen von 78 kDa, 60 kDa und 52 kDa. Es wurde Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR mit Primern durchgeführt, die für Teile einer PPO-Gen-Sequenz spezifisch waren. Die PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese analysiert und besaßen die theoretisch zu erwartende Länge, womit belegt werden konnte, dass zu dem Zeitpunkt, an dem die Enzymextraktionen durchgeführt wurden, PPO-mRNA exprimiert wurde.

6. Literaturverzeichnis

Angelton E.L., Flurkey W.H., (1984): Activation and alteration of plant and fungal polyphenoloxidase isoenzymes in sodium dodecylsulfate electrophoresis; *Phytochem.* 23, 2723-2725

Bachem Ch.W.A., Speckmann G.J., van der Linde P.C.G., Verheggen F.T.M., Hunt M.D., Steffens J.C., Zabeau M., (1994): Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers; *Bio/Technology* 12, 1101-1105

Bauer C.G., Kuehn A., Gajovic N., Skorobogatko O., Holt P.J., Bruce N.C., Makower A., Lowe C.R., Scheller F.W. (1999): New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase; *Fresenius J. Anal. Chem.* 364, 179-183

Bernards M.A., Strack D., Wray V., Ellis B.E., (1991): Caffeoyl glucosides in fungal challenged tomato suspension cultures; *Phytochem.* 30/2, 497-499

Bischoff K.M., Shi L., Kennelly P.J., (1998): The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; *Anal. Biochem.* 260, 1-17

Bohm V., Bitsch R., (1999): Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions to other carotenoids, the lipid status and the antioxidant capacity of human plasma; *Eur. J. Nutr.* 129, 1176-1181

Bolwell G.P., Butt V.S., (1983): Photoinduced changes in o-diphenol oxidase and p-coumarate hydroxylase activities in *Spinach beet* seedlings and leaves; *Phytochem.* 22, 37-45

Bradford M.M., (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochem.* 72, 248-254

Bramley P.M., (2000): Is lycopene benefit to humans health?; *Phytochem.* 54, 233-236

Breinholt V., Lauridsen S.T., Daneshvar B., Jakobsen J., (2000): Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat; *Cancer Letters* 154, 201-211

Buta J.G., Spaulding D.W., (1997): Endogenous levels of phenolics in tomato fruit during growth and maturation; *J. Plant Growth Regul.* 16, 43-46

Constabel C.P., Bergey D.R., Ryan C.A., (1995): Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense; *Plant Biol.* 92, 407-411

Constabel C.P., Ryan C.A., (1998): A survey of wound and methyljasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants; *Phytochem.* 47, 507-511

Decker H., Tuczec F., (2000): Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism; *Trends in Biochem. Sci.* 25, 392-397

- Dincer B., Colak A., Aydin N., Kadioglu A., Güner S., (2002): Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica L.*, rosaceae); Food Chem. 77, 1-7
- Dixon R.A., Chen F., Guo D., Parvathi K., (2001): The biosynthesis of monolignols: a „metabolic grid“, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units?; Phytochem. 57, 1069-1084
- Eicken C., Zippel F., Büldt-Karentzopoulos K., Krebs B., (1998): Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet-potatoes (*Ipomoeas batatas*) containing a type-3 dicopper center; FEBS L. 436, 293-299
- Elliger C.A. et al., (1981): Caffeoyl esters of glucaric acid in *Lycopersicon esculentum* leaves; Phytochem. 20/5, 1133-1134
- Espin J.C., Morales M., Varon R., Tudela J., Garcia Canovas F., (1997 a): Monophenolase activity of polyphenol oxidase of *Blanquilla pear*; Phytochem. 44, 17-22
- Espin J.C., Ochoa M., Tudela J., Garcia-Canovas F., (1997 b): Monophenolase activity of strawberry polyphenol oxidase; Phytochem. 45, 667-670
- Espin J.C., Tudela J., Garcia-Canovas F., (1997 c): Monophenolase activity of polyphenol oxidase from *Artichoke Heads (Cynara scolymus L.)*; FEBS L. 445, 103-110
- Fenoll L.G., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Molina F., Garcia-Canovas F., Tudela J., (2002): Michaelis constants of mushroom tyrosinase with respect to oxygen in the presence of monophenols and diphenols; Int.J.of Biochem. & Cell Biol. 34, 332-336
- Fenoll L.G., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Sevilla F., Garcia-Ruiz P.A., Varon R., Garcia-Canovas F., Tudela J., (2001): Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones; Biochim. Biophys. Acta 1548, 1-22
- Fleuriet A. and Macheix J.J., (1985): Tissue compartementation of phenylpropanoid metabolism in tomatoes during growth and maturation; Phytochem. 24/5, 929-932
- Franke R., Humphreys J.M., Hemm M.R., Denault J.W., Ruegger M.O., Cusumano J.C., (2002): The arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism; the Plant J. 30, 33-45
- Frohne D., Pfänder H.J., (1997): Giftpflanzen; Wissenschaftl. Verlagsgesell. Stuttgart 4. Aufl.
- Gabriel O., (1971): Locating enzymes on gels; Methods in Enzymology 22, 578-604
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K., (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells; Exp. Cell Res. 50, 151-158
- Giuliano G., Bartley G.E., Sclonik P.A., (1993): Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development; The Plant Cell 5, 379-387

- Goldbeck J.H., Cammarata K.V., (1980): Spinach thylakoid polyphenol oxidase; *Plant Physiol.* 67, 977-984
- Goldman M.H.S., Seurinck J., Marins M., Goldman G.H., Mariani C., (1998): A tobacco flower-specific gene encodes a polyphenol oxidase; *Plant Mol. Biol.* 36, 479-485
- Gomez-Lopez V.M., (2002): Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado; *Food Chem.* 77, 163-169
- Gooding P.S., Bird C., Robinson S.P., (2001): Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase; *Planta* 213, 748-757
- Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G. (1993): *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*; Springer Verlag 5. Aufl. ISBN 3-54052638-2
- Ho Kwok-Ki (1999): Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, aranda „christine130“; *Plant Physiol. Biochem.* 37, 841-848
- Hunt M.D., Eannetta N.T., Yu H., Newman S.M., Steffens J.C., (1993): cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase; *Plant Mol. Biol.* 21, 59-68
- Hutcheson S.W., Buchanan B.B., (1980): Polyphenol oxidation by *Vicia faba* chloroplast membranes; *Plant Physiol.* 66, 1150-1154
- Huttermann A., Mai C., Kharazipour A. (2001): Modifikation of lignin for the production of new compounded materials; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 387-394
- Imbert T.F. (1998): Discovery of podophyllotoxins; *Biochimie* 80, 207-222
- Jimenez-Cervantes C., Martinez-Esparza M., Solano F., Lozano J.A., Garcia-Borron J.C., (1998): Molecular interactions within the melanogenic complex: formation of heterodimers of tyrosinase and TRP1 from B16 mouse melanoma; *Biochem. And Biophys. Res. Communication* 253, 761-767
- Johannes Ch., Majcherczyk A., (2000): Laccase activity tests and laccase inhibitors; *J. of Biotechnol.* 78, 193-199
- Kahn V., Andrawis A., (1985): Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone; *Phytochem.* 24, 905-908
- Kahn V., Pomerantz S.H., (1980): Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase; *Phytochem.* 19, 379-385
- Keller H., Hohlfeld H., Wray V., hahlbrock K., Scheel D., Strack D., (1996): Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *solanum tuberosum*; *Phytochem.* 42 389-396
- Lax A.R., Vaughn K.C. (1991): Colocalization of polyphenooxidase and photosystem II proteins; *Plant. Phsiol.* 96, 26-31

Li L., Steffens J.C., (2002): Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance; *Planta* online publ. DOI 10.1007/s00425-002-0750-4

Linsmaier E.M., Skoog F., (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures; *Physiol. Plant* 18, 100-127

Martens H., Nellen W. (2002): Epigenetisches Genesilencing: RNA Interferenz und Antisense RNA; *Biospektrum* 4/02 8 Jahrgang, 351-354

Martens S. (2000): Genetische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Flavonbiosynthese bei *Gerbera* Hybriden; Dissertation TU-München

Mascio P.D., Kaiser S., Sies H., (1989): Lycopene is the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher; *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 532-538

Mayer A.M. (1987): Polyphenol oxidases in plants-recent progress; *Phytochem.* 26, 11-20

Mayer A.M., Staples R.C., (2002): Laccase: new functions for an old enzyme; *Phytochem.* 60, 551-565

Mazzafera P., Robinson S.P., (2000): Characterization of polyphenol oxidase in coffee; *Phytochem.* 55, 285-296

Mizutani F., Golam Rabbany A.B.M., Akiyoshi H., (1998): Inhibition of ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity by tropolones; *Phytochem.* 48, 31-34

Muir W.H., Hildebrandt A.C., Riker A.J., (1954): Plant tissue cultures produced from single isolated plant cells; *Science* 119, 877-887

Mülhardt C., (2002): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*; Spektrum Akad. Verlag Gustav Fischer 3. Auflage

Murashige T., Skoog F., (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures; *Physiol. Plant* 15, 473-497

Newman S.M., Eannetta N.T., Yu H., Prince J.P., de Vicente M. C., Tanksley S.D., Steffens J.C., (1993): Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family; *Plant Mol. Biol.* 21, 1035-1051

Partington J.C., Bolwell G.P., (1996): Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tubers; *Phytochem.* 42, 1499-1502

Parvathi K., Chen F., Guo D., Blount J.W., Dixon R.A., (2001): Substrate preferences of *o*-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-methylation of monolignols; *The Plant Journal* 25, 193-202

Pearce G. et al., (1998): Accumulation of feruloyltyramine and *p*-coumaryltyramine in tomato leaves in response to wounding; *Phytochem.* 47/4, 659-664

Petersen M., Alfermann A.W., (1988): Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *coleus blumei*: hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase; Z. Naturforsch. 43 c, 501-504

Pierrel M.A., Batard Y., Kazmaier M., Mignotte-Vieux C., Durst F., Werck-Reichhart D., (1994): Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast; Europ. J. of Biochem. 224, 835-844

Pommer U., (2000): Cytochrom P450 abhängige Hydroxylierungen im Phenylpropansäure-Stoffwechsel höherer Pflanzen; Posterpräsentation Botanikertagung 2000 in Jena

Raymond J., RakariYatham N., Azanza J.L., (1993): Purification and some properties of polyphenoloxidase from *Sunflower seeds*; Phytochem. 34, 927-931

Rehm H., (2000): Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 3. Auflage

Reinhard E., Alfermann A.W., (1980): Biotransformation by plant cell cultures; Advances in Biochem. Engineering 16; Plant cell cultures, Fiechter A. (Hrsg.), 51-83, Springer Verlag Berlin Heidelberg

Rhodes M.J.C. and Woodtorion S.C., (1976):The enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to p-coumarylquinic and chlorogenic acids in tomato fruits; Phytochem. 15, 947-951

Richter G. (1996):Biochemie der Pflanzen;Georg Thieme Verlag Stuttgart

Rimpler H., (1999): Biogene Arzneistoffe; Deutscher Apothekerverlag Stuttgart 2. Aufl.

Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lefebvre L.R., Sanchez E., Romero L., (2001): Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants; Plant scie. 160, 315-321

Rodriguez-Lopez J.N., Fenoll L.G., Penalver M.J., Garcia-Ruiz P.A., Varon R., Martinez-Ortiz F., Garcia-Canovas F., Tudela J., (2001): Tyrosinase action on monophenols evidence for direct enzymatic release of o-diphenol; Biochim. et Biophys. Acta 1548, 238-256

Rompel A., Fischer H., Meiwes D., Büldt-Karentzopoulos K., Dillinger R., Tuzcek F., Witzel H., Krebs B., (1999 b): Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin; JBIC 4, 56-63

Rompel A., Fischer H., Meiwes D., Büldt-Karentzopoulos K., Magrini A., Eicken C., Gerdemann C., Krebs B., (1999 a): Substrate specificity of catechol oxidase from *Lycopus europaeus* and characterization of the bioproducts of enzymic caffeic acid oxidation; FEBS L. 445, 103-110

Römpp Chemie Lexikon (1995); Georg-Thieme Verlag Stuttgart

Sato M. Hasegawa M., (1976): The latency of spinach chloroplast phenolase; Phytochem. 15, 61-65

- Schmidt A. et al., (1998): Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*; *Planta* 205,51-55
- Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn A., Meyer D., Ullmann P., Werck-Reichhart D., (2001): CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway; *JBC* 276, 36566-36574
- Seitz H.U., Seitz U., Alfermann A.W.,(1985): *Pflanzliche Gewebekulturen, ein Praktikum*; Fischer Verlag Stuttgart
- Servili M., De Stefano G., Piacquadio P., Sciancalepore V. (2000): A novel method for removing phenols from grape must; *Am.J.Enol.Vitic.* 51, 357-361
- Shin R., Froderman T., Flurkey W.H., (1997): Isolation and characterization of a *mung bean* leaf polyphenol oxidase; *Phytochem.* 45 15-21
- Söderhäll I., (1995): Properties of carrot polyphenoloxidase; *Phytochem.* 39, 33-38
- Sokolenko A., Fulgosi H., Gal A., Altschmied L., Ohad I., Herrmann R.G., (1995): The 64 kDa polypeptide of spinach may not be the LHCII kinase, but a lumen-located polyphenol oxidase; *FEBS Letters* 371, 176-180
- Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E., (1996): Multicopper oxidases and oxygenases; *Chem. Rev.* 96, 2563-2605
- Sommer A., Newman E., Steffens J.C., Mayer A.M., Harel E., (1994): Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase; *Plant Physiol.* 105, 1301-1311
- Steffens J.C., Harel E., Hunt M.D., (1994): Polyphenol oxidase; *Recent Advances in Phytochemistry* 28, 275-312
- Steiner U., Schliemann W., Böhm H., Strack D., (1999): Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants; *Planta* 208, 114-124
- Stonier T., Macgladrie K., Shaw G., (1979): Chlorogenic acid, a low molecular weight auxin protector in sunflower; *Plant Cell Environ* 2, 79-82
- Strack D. and Gross W., (1990): Properties and changes of chlorogenic acid:glucaric acid caffeoyltransferase from tomato (*Lycopersicon esculentum*); *Plant Physiol.* 92, 41-47
- Strack D. et al., (1987): Enzymic synthesis of caffeoylglucaric acid from chlorogenic acid and glucaric acid by a protein preparation from tomato cotyledons; *Plant Physiol.* 83, 475-478
- Stryer L., (1994): *Biochemie*; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Takahashi S., Fujita Y., (1991): Production of Shikonin; *Plant Cell Culture in Japan*, Komamine A. (Hrsg.), 72-78, CMC Tokio
- Thipyapong P., Hunt M.D., Steffens J.C., (1995): Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase; *Phytochem.* 40, 673-676

Thipyapong P., Joel D.M., Steffens J.C., (1997 b): Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development; *Plant Physiol.* 113, 707-718

Thipyapong P., Steffens J.C., (1997 a): Tomato polyphenol oxidase; *Plant Physiol.* 115, 409-418

Tolbert N.E., (1973): Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts; *Plant Physiol.* 51, 234-244

Trémolières M., Bieth J.G., (1984): Isolation and characterization of the polyphenoloxidase from senescent leaves of *Black poplar*; *Phytochem.* 23, 501-505

van Bragt J. et al., (1965): Identification of neochlorogenic and 3-o-feruloylquinic acids in tomato plants; *Phytochem.* 4, 977-979

Vaughan P.F.T., Butt V.S., (1969): The hydroxylation of p-coumaric acid by an enzyme from leaves of spinach beet (*Beta vulgaris L.*); *Biochem. J.* 113, 109-115

Wang Z.X., Li S.M., Löscher R., Heide L., (1997): 4-Coumaryl coenzyme A 3-hydroxylase activity from cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* and its relationship to polyphenol oxidase; *Archives of Biochem. And Biophys.* 347/2,249-255

Wititsuwannakul D., Chaeronthiphakorn N., Pace M., Wititsuwannakul R., (2002): Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization; *Phytochem.* 61, 115-121

Danksagung!

Prof. Dr. Maike Petersen danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Themas und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Besonders möchte ich mich für Ihre ständige unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Prof. Dr. Birgit Dräger möchte ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Dr. J.C. Steffens möchte ich danken für die Überlassung der Tomatensamen.

Dr. D. Werck-Reichhart danke ich für die p-Cumarylchinasäure.

Bei Dr. Anja Berger, Dr. Kyung-Hee Kim, Dr. Johanna Schmidt, Dr. Elisabeth Szabo, Dr. Katharina Vogelsang, Kerstin Kranz, Stephan Kuhlmann und allen anderen Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich für die sehr schöne Zeit im Labor, für Ihre Hilfsbereitschaft und für das kollegiale Miteinander bedanken.

Oliver Hegener danke ich für die technische Hilfestellung beim Erstellen dieser Arbeit.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während dieser Zeit.