Untersuchungen zum Biosyntheseweg von Flavonolignanen in der Mariendistel *Silybum marianum*

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

dem Fachbereich der Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Sandra Ditzler
aus Leverkusen

Marburg/Lahn 2021

Dem Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

eingereicht am: 01.09.2021

Erstgutachterin: Prof. Dr. Maike Petersen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Udo Bakowsky

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2021

Hochschulkennziffer: 1180

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Untersuchungen zum Biosyntheseweg von Flavonolignanen in der Mariendistel *Silybum marianum*

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

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

x S. Ditzler

Sandra Ditzler

Marburg, den 21. Oktober 2021

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich von ganzem Herzen Prof. Dr. Maike Petersen für ihre wundervolle Betreuung danken. Danke, dass du deine Türe immer für mich und meine Kolleg*innen offenstehen hast. Dafür, dass du uns immer mit Rat und Tat zur Seite stehst, egal ob wir mit fachlichen oder persönlichen Anliegen zu dir kommen. Danke, dass du mir/uns immer das Gefühl gegeben hast, nicht nur Teil einer Arbeitsgruppe, sondern Teil einer Familie zu sein. Ich danke dir sehr für die gemeinsame und vor allem erkenntnisreiche Zeit.

Ebenfalls möchte ich Prof. Dr. Udo Bakowsky für seine Betreuung als Zweitgutachter danken.

Einen weiteren besonderen Dank möchte ich an meine gesamte Arbeitsgruppe aussprechen: Tobias Busch, Lucien Ernst, Anne Jahn, Paul Bömeke, Christoph Schwarze, Christoph Kentrath, Elke Bauerbach, Hanna Lütjens sowie Julia Wohl und Olga Haag. Ich danke euch für diese wundervolle Zeit. Mir werden die vielen lustigen Gespräche, die verrückten Laborexperimente, EXIT Spieleabende und gemeinsamen Mittagspausen sehr fehlen. IHR werdet mir sehr fehlen. In diesem Sinne:

Jeder Freund eröffnet uns eine neue Welt, eine unentdeckte Welt,
die erst durch die Begegnung mit ihm geboren wird.
Anaïs Nin

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken. Danke, dass ihr mich in all den Jahren immer auf meinen Wegen und bei meinen Entscheidungen begleitet habt. Der Weg war nicht immer leicht. Er war holprig, er war steinig, führte über Umwege und endete manchmal auch in einer Sackgasse. Dennoch wart ihr immer an meiner Seite und habt mir Mut gegeben. Ich danke euch sehr für diese bedingungslose Liebe und Unterstützung.

Manche wissen gar nicht,
wie gut es tut, dass sie da sind
und uns helfen, das Schwere zu tragen
und das Leichte zu genießen.
Jochen Mariss

Diese Arbeit ist meinen Eltern und Nox gewidmet.

PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

Posterpräsentationen

Flavonolignan biosynthesis in *Silybum marianum* Formation of silymarin components. Botanikertagung 2017, Kiel.

Flavonolignan biosynthesis in *Silybum marianum* - Metabolic key enzymes. Botanikertagung 2019, Rostock.

Vorträge:

Biosynthesis of flavonolignans in *Silybum marianum.* Wissenschaftliche Vortragsreihe am Institut für Pharm. Biologie und Biotechnologie. 2018, Marburg

Biosynthesis of flavonolignans in *Silybum marianum.* Wissenschaftliche Vortragsreihe am Institut für Pharm. Biologie und Biotechnologie. 2020, Marburg

INHALTSVERZEICHNIS

I. Abkürzungen xiv

II. Einleitung 1

1. *Silybum marianum* - Klassifikation und Morphologie 1

1.1 Inhaltsstoffe und pharmazeutische Anwendung 3

1.2 Bioverfügbarkeit, Zubereitung und Dosierung 5

1.3 Silymarin als Option zur Behandlung einer COVID-19 induzierten Lungenerkrankung 6

2. Pflanzlicher Sekundärstoffwechsel 7

2.1 Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel 8

2.2 Monolignolsynthese (Coniferylalkohol) 9

2.3 Flavonoidbiosynthese (Taxifolin) 10

2.4 Silymarin-Biosynthese 11

3. Peroxidasen 12

4. Laccasen 13

5. Dirigierende Proteine 13

6. Phenylalanin Ammoniak-Lyase 15

6.1 Therapeutische Anwendung - das Medikament Pegvalinase 17

7. Chalkonsynthase 18

8. Cinnamoyl-CoA Reduktase 19

9. Coniferylalkohol Dehydrogenase 19

10. Zielsetzung dieser Arbeit 20

III. Material und Methoden 21

A. Allgemeine Methoden 21

1. Pflanzenanzucht zur RNA- und DNA-Isolation 21

2. Herstellung einer *Silybum marianum* Kalluskultur 21

2.1 Überimpfen und Aufrechterhaltung der Suspensionskultur 21

B. Proteinbiochemische Methoden 22

3. Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford 22

4. Proteinfällung mit Trichloressigsäure 22

5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 22

6. Western Blot 23
6.1 Inkubation mit Antikörpern 24
6.2 Immunfärbung 24
7. Synthese von Coenzym A-aktivierten Hydroxyzimtsäuren 24
7.1 Berechnung und Einstellung der Konzentration 25
8. Expression rekombinanter Proteine 26
8.1 *E. coli* SoluBL21 26
8.1.1 Zellernte 26
8.1.2 Zellaufschluss und Isolierung des gewünschten Zielproteins 26
8.2 SuperMan5-20 GlycoSwitch® *Pichia* (*Komagataella phaffii*) 26
8.2.1 Ernte von Zellen und Medium 27
8.2.2 Zellaufschluss der *Pichia*-Zellen 27
8.3 *Physcomitrium patens* 27
8.3.1 Vorkultur 27
8.3.2 Hauptkultur 27
8.3.3 Zellernte und Gewinnung des Rohextrakts 28
9. Reinigung mit His-tag versehener Proteine über eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni-NTA) 28
9.1 Aufreinigung über Tropfsäulen 28
9.2 Aufreinigung über das automatisierte ÄKTA™ System 29
9.3 PD-10 Chromatographie zur Proteinentsalzung 30
10. Enzymcharakterisierung 30
10.1 Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) 30
10.1.1 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts 31
10.1.2 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur 31
10.1.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit L-Histidin 32
10.1.4 Enzymkinetik 32
10.1.4.1 L-Phenylalanin 32
10.1.4.2 D-Phenylalanin 32
10.1.4.3 L-Tyrosin 32

10.2 Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD) 33
10.2.1 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts 33
10.2.2 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur.....33
10.2.3 Enzymkinetik 34
10.2.3.1 Coniferylalkohol.....34
10.2.3.2 $NADP^+$ 34
10.3 Chalkonsynthase (CHS) 34
10.3.1 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts 34
10.3.2 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur.....35
10.3.3 Bestimmung der CHS Aktivität mit Caffeoyl-CoA als Substrat 35
10.3.4 Enzymkinetik 36
10.3.4.1 4-Cumaroyl-CoA 36
10.3.4.2 Malonyl-CoA 36
10.4 Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR).....37
10.4.1 Photometrische Bestimmungsmethode.....37
10.4.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts 37
10.4.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur.....38
10.4.4 Vergleich unterschiedlicher Hydroxycinnamoyl-CoA Thioester 38
10.4.5 Enzymkinetik 38
10.4.5.1 Feruloyl-CoA mit $NADPH_2$ als Cosubstrat 38
10.4.5.2 Feruloyl-CoA mit $NADH_2$ als Cosubstrat.....39
10.4.5.3 Variation von $NADPH_2$ mit Feruloyl-CoA 39
10.4.5.4 Variation von $NADH_2$ mit Feruloyl-CoA.....39
10.4.5.5 Sinapoyl-CoA mit $NADPH_2$ als Cosubstrat 39
10.5 Peroxidase.....39
C. Analytische Methoden 40
11. Photometrische Bestimmungsmethoden.....40
11.1 Berechnung der spezifischen Enzymaktivität 40
11.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA 41
12. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....41

12.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Chalkonsynthase (CHS) mittels HPLC 42

D. Molekularbiologische Methoden....43

13. RNA-Extraktion 43

14. cDNA-Synthese 43

15. DNA-Isolierung 43

16. Polymerasekettenreaktion 44

16.1 Klassische PCR 44

16.1.1 GoTaq Polymerase 44

16.2 PCR mit korrekturaktiven Polymerasen 45

16.2.1 Accuprime® DNA Polymerase 45

16.2.2 KOD® DNA-Polymerase 46

16.3 RACE Polymerasekettenreaktion 46

16.4 In-Fusion Polymerasekettenreaktion 48

16.5 Fusions-Polymerasekettenreaktion 49

16.6 Kolonie-Polymerasekettenreaktion 51

17. Agarosegelelektrophorese 51

17.1 Gelextraktion und Aufreinigung 52

18. Ligation 52

18.1 pDRIVE Vektor 52

18.2 pET15b Vektor 53

18.3 pRSET C Vektor 53

18.4 pPICZα-A Vektor 53

18.5 In-Fusion Klonierung 53

19. *Escherichia coli* Bakterienstämme 54

19.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen 54

19.2 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen 54

19.3 Vervielfältigung ausgewählter Kolonien 55

19.4 Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen 55

20. Plasmidisolierung 55

21. Restriktionsverdau 56
21.1 pDRIVE® Vektor 56
21.2 pET15b Vektor 56
21.3 pRSET C Vektor 56
21.4 pPICZα-A Vektor 56
22. Glycoswitch® Superman5 Hefesystem 57
22.1 Vermehrung des pPICZα-A Vektors 57
22.2 Linearisierung des Vektors mit integriertem Zielgen 57
22.3 Aufreinigung des linearisierten Vektors 57
22.4 Vermehrung von *Pichia pastoris* Superman5 Hefezellen 57
22.5 Lithiumchlorid-Transformation in *Pichia pastoris* Superman5 Hefezellen 58
23. *Physcomitrium patens* 59
23.1 Zielgen und Vektorvorbereitung 59
23.2 Herstellung von Protoplasten 59
23.3 Isolierung von Protoplasten 59
23.3.1 Bestimmung der Protoplastenzahl 60
23.4 Transformation 60
23.5 Regeneration und Selektion 61
24. Anhang I 62
24.1 Zellkulturmedien 62
24.2 Pufferlösungen 67
24.3 Bradford Lösung (nach Bradford 1976) 68
24.4 Transformation von *Physcomitrium patens* 68
24.5 SDS-PAGE 68
24.6 Agarose-Gelelektrophorese 69
24.7 Lösungen zur Isolierung von genomischer DNA 69
24.8 Lösungen zur Plasmidisolierung nach Qiagen Protokoll 69
24.9 Lösungen für chromatographische Methoden 70
24.10 Materialien und Geräte 71
24.10.1 Chemikalien 71

24.10.2 Reagenzien und Kits 75
24.10.3 Genotyp von Laborstämmen 76
24.10.4 Geräte 76
24.10.5 Verwende Software und Datenbänke 78
24.10.6 Vektorkarten 79
24.10.7 Liste verwendeter Primer 81
24.10.8 Verwendete Molekularmarker 82
IV. Ergebnisse 83
1. Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) 83
1.1 Phenylalanin Ammoniak-Lyase Isoform 1 (PAL 1) 84
1.1.1 Expression der PAL 1 in *Escherichia coli* 86
1.1.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes 87
1.1.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur 87
1.1.4 Enzymkinetik: L-Phenylalanin 88
1.1.5 Enzymkinetik: D-Phenylalanin 89
1.1.6 Enzymkinetik: L-Tyrosin 91
1.2 Phenylalanin Ammoniak-Lyase Isoform 2 (PAL 2) 92
1.2.1 Expression der PAL 2 in *Escherichia coli* 94
1.2.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes 95
1.2.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur 96
1.2.4 Enzymkinetik: L-Phenylalanin 96
1.2.5 Enzymkinetik: D-Phenylalanin 97
1.2.6 Enzymkinetik: L-Tyrosin 99
2. Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD) 100
2.1 Expression der CAD in Escherichia coli 102
2.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes 102
2.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur 103
2.4 Enzymkinetik: Coniferylalkohol 104
2.5 Enzymkinetik: $NADP^+$ 105
3. Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR) 107

3.1 Expression der rekombinanten CCR 109
3.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes 109
3.3 Vergleich unterschiedlicher Hydroxycinnamoyl-CoA Thioester 110
3.4 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur 111
3.5 Enzymkinetik: Feruloyl-CoA (Cofaktor: $NADPH_2$) 112
3.6 Enzymkinetik: Feruloyl-CoA (Cofaktor $NADH_2$) 113
3.7 Enzymkinetik: $NADPH_2$ (Substrat Feruloyl-CoA) 114
3.8 Enzymkinetik: $NADH_2$ (Substrat Feruloyl-CoA) 115
3.9 Enzymkinetik: Sinapoyl-CoA (Cofaktor: $NADPH_2$) 116
4. Chalkonsynthase (CHS) 118
4.1 Expression rekombinanter CHS 120
4.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes 121
4.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur 122
4.4 Bestimmung der CHS Aktivität mit Caffeoyl-CoA als Substrat 123
4.5 Enzymkinetik: Malonyl-CoA 123
4.6 Enzymkinetik: 4-Cumaroyl-CoA 124
5. Peroxidase 126
5.1 Expression in *Physcomitrium patens* 126
6. Dirigierende Proteine 1 und 2 (DIR 1 und DIR 2) 128
6.1 Expression in *Physcomitrium patens* 128
6.2 Expression in *SuperMan5-20* GlycoSwitch® *Pichia* 128
V. Diskussion 130
1. Phenylalanin Ammoniak-Lyase 131
2. Cinnamoyl-CoA Reduktase 136
3. Coniferylalkohol Dehydrogenase 137
4. Chalkonsynthase 138
5. Peroxidase 140
6. Dirigierende Proteine 141
7. Schlussfolgerung 141
8. Ausblick 144

VI. Zusammenfassung 145

VII. Summary 147

VIII. Anhang II 149

1. CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment der Aminosäuresequenzen der beiden PAL-Isoformen aus *Silybum marianum* und der HAL aus *Pseudomonas putida* 149
2. Chalkonsynthase: Kalibriergerade für Naringenin 150
3. Cinnamoyl-CoA Reduktase: Spektrum der einzelnen Substrate und des Kofaktors . 150

IX. Literaturverzeichnis 151

Lebenslauf 167

I. Abkürzungen

Maße und Einheiten

bp =	Basenpaar(e)
Da =	Dalton
kat =	Katal (1 mol s^{-1})
k_{cat} =	Wechselzahl
K_m =	Michaelis-Menten-Konstante
M =	Molar, mol l^{-1}
mA =	Milliampere
MPa =	Megapascal
nm =	Nanometer
OD_{600} =	Optische Dichte bei 600 nm
T_m =	Schmelztemperatur
u =	Units (enzymatische Aktivität)
UpM =	Umdrehungen pro Minute
V =	Volt
v/v =	Volumen/Volumen
V_{max} =	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
w/v =	Gewichtsvolumen (engl. weight/volume)

Molekularbiologische Bezeichnungen

cDNA =	Komplementäre DNA
DNA =	Desoxyribonukleinsäure
dNTP =	Desoxyribonukleosid-triphosphat(e)
gDNA =	genomische DNA
mRNA =	messenger Ribonukleinsäure
PCR =	Polymerasekettenreaktion

Nukleotide

A =	Adenin
C =	Cytosin
G =	Guanin
T =	Thymin
U =	Uracil

Nukleotidzuweisungen

N =	unspezifisch
M =	Adenin (A) oder Cytosin (C)
K =	Guanin (G) oder Thymin (T)
S =	Guanin (G) oder Cytosin (C)
W =	Adenin (A) oder Thymin (T)
Y =	Cytosin (C) oder Thymin (T)

Kanonische Aminosäuren

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

Formeln

ΔE =	Steigung (Extinktionsdifferenz)
ε =	spezifischer Extinktionskoeffizient
c_{Prot} =	Proteinmenge im Testansatz
d =	Schichtdicke der Küvette
F =	Multiplikationsfaktor
N =	Gesamtzellzahl
V =	Gesamtvolumen des Testansatzes
V_f =	Verdünnungsfaktor
x =	Zellzahl (Mittelwert von 6 Großfeldern)

Organismen

E. coli =	*Escherichia coli*
P. patens =	*Physcomitrium patens*
P. putida =	*Pseudomonas putida*
S. marianum =	*Silybum marianum*

Datenbanken

BLAST =	Basic Local Alignment Search Tool
EMBL =	European Molecular Biology Laboratory
CNGBdb =	China National Genebank Database
NCBI =	National Center for Biotechnology Information
TICA =	The International Compositae Alliance

Sonstiges

EC =	Enzyme Commission (numbers)
EMA =	Europäische Arzneimittelbehörde
COVID 19 =	Corona-Virus Erkrankung 2019
HMPC =	Ausschuss für pflanzliche Arzneimittel
HPLC =	high pressure liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
PKU =	Phenylketonurie
RAAS =	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
SARS-CoV-2 =	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

Proteine

4CL =	4-Cumarat Coenzym A Ligase
ACE-2 =	Angiotensin-konvertierendes Enzym-2
C4H =	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CAD =	Coniferylalkohol Dehydrogenase
CCoAOMT =	Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferase
CCR =	Cinnamoyl-CoA Reduktase
CYP98 =	Cytochrom P450 Monooxygenase
CHI =	Chalkonisomerase

CHS =	Chalkonsynthase
DFR =	Dihydrokaempferol 4-Reduktase
DIR =	Dirigierende Proteine
F3`H =	Flavanon-3´-Hydroxylase
F3H =	Flavanon 3-Hydroxylase
HAL =	Histidin Ammoniak-Lyase
HCT =	Hydroxycinnamoyltransferase
IFN-ɣ =	Interferon-Gamma
IgG =	Immunglobulin G
IgM =	Immunglobulin M
IL-4/IL-6 =	Interleukin-4 oder -6
LACC =	Laccase
LDOX =	Leucocyanidin Oxygenase
PAH =	Phenylalaninhydroxylase
PAL =	Phenylalanin Ammoniak-Lyase
PTAL =	Phenylalanin/Tyrosin Ammoniak-Lyase
POD =	Peroxidase
SAD =	Sinapylalkohol Dehydrogenase
STS =	Stilbensynthase
TAL =	Tyrosin Ammoniak-Lyase
TNF-α =	Tumornekrosefaktor α
TMPRSS2 =	Transmembrane Serinprotease-2

Substanzen, Chemikalien und Puffer

ABTS =	2,2′-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APS =	Ammoniumpersulfat
BH4 =	Tetrahydrobiopterin
BCIP =	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
CAPS =	*N*-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
CHES =	*N*-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
CoA =	Coenzym A
CTAB =	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO =	Dimethylsulfoxid
DOPA =	L-Dihydroxyphenylalanin
DTT =	Dithiothreitol
EDTA =	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG =	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

MIO =	4-Methyliden-Imidazol-5-on
MOPS =	3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure
NAD^+ =	Nicotinamidadenindinukleotid
$NADH_2$ =	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
$NADP^+$ =	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
$NADPH_2$ =	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NBT =	Nitroblautetrazoliumchlorid
NTA-Ni =	Nickel-Nitriloessigsäure
PEG =	Polyethylenglycol
PVDF =	Polyvinylidendifluorid
SDS =	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE =	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
TAE =	Tris-Essigsäure-EDTA
TB =	Terrific broth
TBS-T =	Tris-buffered saline
TCA =	Trichloressigsäure
TE =	Tris-EDTA
TEMED =	Tetramethylethylendiamin
X-Gal =	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

II. Einleitung

1. *Silybum marianum* - Klassifikation und Morphologie

Die Mariendistel, *Silybum marianum* (L.) GAERTN, ist eine ein- bis zweijährig wachsende, distelartige Pflanze mit einer Wuchshöhe von bis zu 150 cm (Abenavoli 2010). Sie gehört zur Familie der Asteraceae (Korbblütler) innerhalb der Klasse der bedecktsamigen Pflanzen (Magnoliopsida). Die Mariendistel gehört zur Gruppe der Eudikotyledonen, die einen Großteil der zweikeimblättrigen (dikotylen) Pflanzen umfasst (International Compositae Alliance (TICA) Webseite; Taxname:1106175). Sie trägt auch die Namen Frauendistel, Silberdistel oder Milchdistel.

Die Blätter der Distel sind hellgrün und lanzettartig geformt. Sie besitzen an ihren Rändern bis zu 8 mm lange Stacheln. Besonders auffallend ist ihre weiße Marmorierung. Der Legende nach stellt das weiße Muster auf den Blättern die Muttermilch der Jungfrau Maria dar, die auf die Pflanze verschüttet wurde, während sie Jesus bei ihrer Flucht nach Ägypten stillte (Corchete 2008). Die Blütenkörbchen der Mariendistel sind lang gestielt und purpurfarben (Abb. 1). Es gibt jedoch noch eine Variante (*Silybum marianum* var. *albiflorum*) mit schneeweißen Blütenkörbchen (Abb. 2) (Ahmed et al 2019). Die Körbchen beider Pflanzen besitzen einen Durchmesser von 5-6 cm und sind von langen Hüllblättern mit starren Dornen umgeben.

Abb. 1 *Silybum marianum* mit ihren typischen grün-weiß marmorierten Blättern und purpurfarbigem Blütenkörbchen

Abb. 2 *Silybum marianum* var. *albiflorum* mit ihrem schneeweißen Blütenkörbchen und ebenfalls typischen grün-weiß marmorierten Blättern.

Die Mariendistel ist vor allem in Gebieten des Mittelmeerraumes heimisch. Sie wächst jedoch auch in Indien, China, Afrika und Australien. Auch in Europa wird sie bereits seit Jahrhunderten angebaut. Europäische Kolonisten brachten die Pflanze im 19. Jahrhundert nach Nord- und Südamerika (Abenavoli et al. 2010).

Die Keimung der Pflanze erfolgt im Frühjahr und Herbst und wird durch einsetzende Regenfälle begünstigt. Distelsämlinge benötigen Licht zum Gedeihen. Die Mariendistel überwintert als Blattrosette (Abb. 3), die manchmal einen Durchmesser von 1 m erreichen kann. Für die Blütenbildung sind kalte Temperaturen erforderlich. Jede Pflanze kann etwa 10-50 Blütenköpfe ausbilden und pro Blütenkopf etwa 100 Früchte (Achänen) produzieren (Corchete 2008). Diese Anzahl ist jedoch abhängig von der Größe der Pflanze, der Dauer und dem Zeitpunkt ihrer Blüte (Abb. 4). Von den gebildeten und freigesetzten Früchten sind ca. 94 % lebensfähig. Die Samen können im Boden für 9 Jahre und länger überleben (Sindel 1990).

Abb. 3 *S. marianum* überwintert indem die Blätter dicht gedrängt als Rosette angeordnet sind.

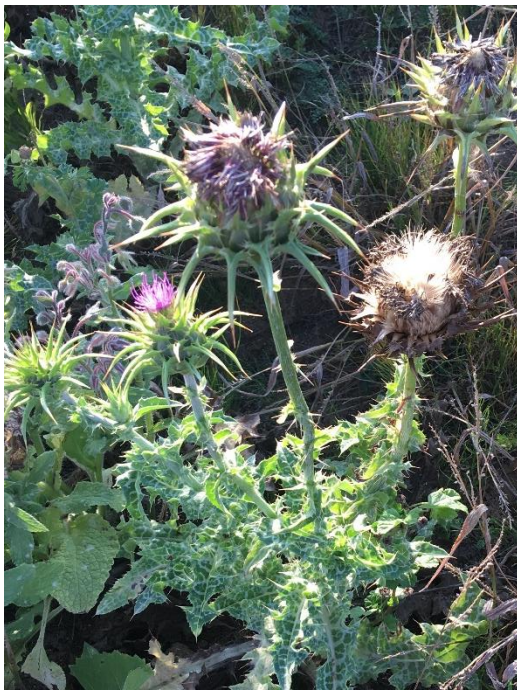


Abb. 4 Verblühte und fruchtausbildende Mariendistel

Die Früchte der Pflanze entwickeln sich aus dem befruchteten Blütenstand und sind 5-8 mm lang, sowie etwa 2-3 mm breit (Bijak 2017). Die Fruchtschale ist glänzend braunschwarz oder matt graubraun gefärbt mit dunkel- oder weißgrauen Maserungen. Frisch gemahlene Früchte besitzen einen kakaoartigen Geruch (Sticher 2010). Jede Frucht besitzt einen weißen Pappus aus vielen flachen feinstacheligen Borsten, die ringförmig angeordnet sind (Keil 2012). Der Pappusschirm öffnet und schließt sich während des Tag-Nacht-Zyklus und wird ebenfalls

durch die Umgebungsluftfeuchtigkeit beeinflusst. Nach der Reifung der Früchte wird die Fruchtausbreitung durch den geöffneten Pappus ermöglicht (Martinelli 2019).

1.1 Inhaltsstoffe und pharmazeutische Anwendung

Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften ist die Mariendistel (*Silybum marianum*) besonders für die medizinische Therapie von Bedeutung (Valková 2020). Die Früchte und Extrakte dieser Pflanze werden bereits seit über 2000 Jahren für die Behandlung von Leber- und Gallenwegserkrankungen verwendet (Delmas et al. 2020).

Eine der frühesten Erwähnungen der (Marien-)Distel findet sich in der Bibel (Genesis 3:18). Nachdem Adam und Eva von Gott aus dem Garten Eden vertrieben wurden, sagte Gott zu ihnen, dass der Ackerboden ihretwegen verflucht ist, sie aber dennoch von ihm essen werden an allen Tagen ihres Lebens. *„Dornen und Disteln lässt er dir wachsen / und die Pflanzen des Feldes musst du essen*“ (Abenavoli 2010). Im Mittelalter nannte man die Früchte der Pflanze „Stechkörner“ und empfahl sie gegen Seitenstechen einzunehmen (Spohn 2014). Bei der Mariendistel handelt es sich um ein traditionelles pflanzliches Arzneimittel zur symptomatischen Linderung von Verdauungsstörungen, Völlegefühl und zur Unterstützung der Leberfunktion. Die Droge wird im angegebenen Anwendungsgebiet ausschließlich aufgrund langjähriger Anwendung eingesetzt (EMA/HMPC/294187/2013 herbal monograph).

Die Mariendistel enthält eine ganze Reihe an Inhaltsstoffen. Den größten Anteil von jeweils 20-30 % machen die fetten Öle und die Eiweiße aus. Die Phytosterole (u.a. Cholesterol) betragen etwa 0,6 %. Der prozentuale Anteil an Tocopherol (Vitamin E) beträgt etwa 0,04 %. Die Flavonolderivate, die unter dem Oberbegriff Silymarin zusammengefasst werden, machen etwa 1,5-3,0 % der gesamten Inhaltsstoffe aus (Bijak 2017). Hierzu gehören die Flavanonolderivate Silybin A und B (ca. 50-60 %), Isosilybin A und B (ca. 5 %), Silychristin (ca. 20 %), sowie Silydianin (ca. 10 %) (Schilcher 2016, Abenavoli 2010) (Abb. 5). Die ersten Versuche, diese aktiven Komponenten zu isolieren, begannen 1958 (Corchete 2008). Im Jahr 1968 isolierten und charakterisierten Wagner und seine Kollegen erstmalig die Hauptbestandteile von Silymarin (Wagner et al. 1968). Im Gegensatz zur purpurfarbigen *Silybum marianum* (L.), enthält *Silybum marianum* var. *albiflorum* neben Silybin Silandrin, Isosilandrin, Silyhermin und Silymonin (Abb. 5) (Szilági et al. 1981).

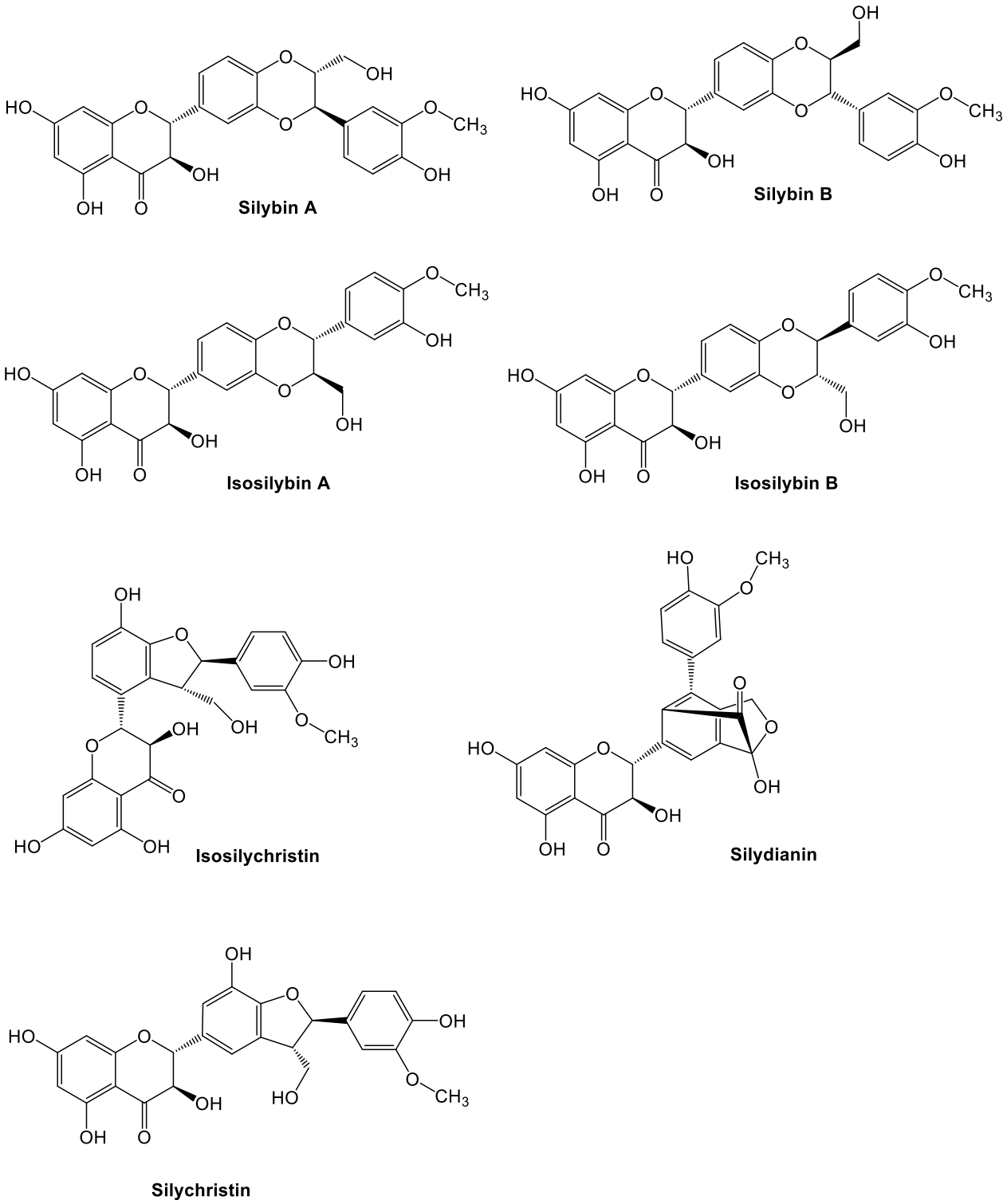


Abb. 5 Darstellung der Silymarin-Bestandteile. Silybin A+B und Isosilybin A+B sind Diastereomere. Silychristin, Isosilychristin und Silydianin sind Regioisomere.

Die letzten fünf Jahre waren geprägt von einem Aufschwung an Publikationen über das Silymarin. Allein im Jahr 2019 wurden die Flavonolignane in mehr als 2670 Zitierungen erwähnt (Delmas et al. 2020). Bei der Hauptwirksubstanz von Silymarin handelt es sich um das Silybin, inklusive seiner Isomere. Nach bisherigem Kenntnisstand wirken die

hepatoprotektiven Eigenschaften des Silybin unter anderem bei der Stabilisierung der Leberzellmembran, weisen eine Radikalfänger-Antioxidans-Funktion auf und bewirken eine Beschleunigung der Leberzellregeneration (Abenavoli 2010). Silybin vermindert die schädigenden Effekte verschiedener Lebergifte wie α-Amanitin, Tetrachlorkohlenstoff, Galactosamin oder Thioacetamid (Sticher 2010). In Tierversuchen konnte eine protektive Wirkung des Silybin bei einer Knollenblätterpilzvergiftung (Phallotoxin) nachgewiesen werden (Scholz und Schwabe 2005). Aktuelle Studien zeigen vielversprechende positive Auswirkungen von Silymarin-Komponenten bei neurologischen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer- (Yaghmaei et al. 2014) und der Parkinson-Krankheit (Ullah und Khan 2018). Darüber hinaus zeigt Silymarin bei *in vivo* und *in vitro* Studien gegen verschiedene Krebsarten ein hemmendes Potenzial (Won et al. 2018). Dosisabhängig kann Silymarin die Proliferation von HSC-4-Mundkrebszellen hemmen und die Caspase-8 abhängige Apoptose fördern. In der Arbeit von Won et al. (2018) unterdrückte das Silymarin auch das Tumorwachstum und -volumen.

1.2 Bioverfügbarkeit, Zubereitung und Dosierung

Die Bioverfügbarkeit bezeichnet den Anteil eines verabreichten Arzneimittels, der im allgemeinen Kreislauf des Organismus erscheint und verfügbar ist (Beubler 2011). Die Bioverfügbarkeit wird in Prozent angegeben und beträgt definitionsgemäß nach einer intravenösen Gabe den maximalen Wert von 100 %. Maßgeblich kann die Bioverfügbarkeit durch die Löslichkeit, das Verteilungsverhalten im Organismus, die Bindungsfähigkeit an Zellstrukturen oder Proteine sowie durch die Stabilität und Zersetzung beeinflusst werden (Lohs et al. 2009).

Kommerziell verfügbare Produkte enthalten etwa 70-80 % an Silymarin. Nach einer oralen Einnahme des Silymarins werden etwa 20-50 % im Gastrointestinaltrakt aufgenommen (Schilcher 2016). Etwa 80 % davon werden über die Galle ausgeschieden und nur etwa 10 % gelangen in den enterohepatischen Kreislauf (Abenavoli et al. 2010). Die geringe Bioverfügbarkeit könnte auf die schlechte Wasserlöslichkeit (Cavaretta 2015) und eine Degeneration der Substanzen durch Verdauungsflüssigkeiten zurückzuführen sein.
Silymarin wird in der Regel in Form von Verkapselungen (z.B. Legalon® von Madaus oder Silymarin® von STADA GmbH, Bionorica SE oder Ratiopharm) und in Form von Dragees (Hevert Arzneimittel GmbH & Co. KG) angeboten. Pflanzliche Auszüge sind auch als Tonikum (SALUS Haus) verfügbar. Bei toxischen Leberschäden wird eine Initialdosis von täglich 400 mg Silymarin empfohlen. Als Erhaltungsdosis sollten täglich mindestens 200 mg Silymarin eingenommen werden (Schilcher 2016). Bei einer Vergiftung mit dem Knollenblätterpilz wird eine intravenöse Gabe von 20 mg kg^{-1} Silibinin, verteilt auf vier Infusionen von jeweils

2 Stunden in 24 Stunden empfohlen (Scholz und Schwabe 2005). Eine Auflistung weiterer Dosierungsempfehlungen sowie einige klinische Studien können in der HMBC-Monographie (EMA/HMPC/294188/2013) eingesehen werden. Der HMPC (Ausschuss für pflanzliche Arzneimittel) gehört zur EMA (Europäische Arzneimittelbehörde) und beschäftigt sich unter anderem mit der Erstellung von Monographien von pflanzlichen Arzneidrogen. HMPC-Monographien enthalten neben den Angaben zur Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Arzneidrogen auch den aktuellsten wissenschaftlichen Kenntnisstand. Alle fünf Jahre werden die Monographien überarbeitet und durch neue Studien und Erkenntnisse aktualisiert. Sie sind öffentlich und kostenlos verfügbar und repräsentieren für alle EU-Mitgliedsstaaten den offiziellen regulatorischen Standard.

1.3 Silymarin als Option zur Behandlung einer COVID-19 induzierten Lungenerkrankung

Silymarin und seine Derivate besitzen eine natürliche antiinflammatorische Aktivität. Sie unterdrücken nachweislich den Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF-α), die Interleukine-4 und -6 (IL-4, IL-6) und das Interferon-Gamma (IFN-ɣ) in broncho-alveolarer Flüssigkeit (Corchete 2008, Nazemian et al. 2010 aus Palit et al. 2021). Aktuell wird das antiinflammatorisch wirkende Medikament Acalabrutinib für die Behandlung der Lungenschäden bei schwer erkrankten COVID-19-Patienten eingesetzt. Bemerkenswerterweise besitzt Silymarin im Mausmodell einen besseren Schutz (Reduktion 73 %) gegen das entzündliche Zytokin IL-1ß (Toklu et al. 2008) im Vergleich zum Wirkstoff Acalabrutinib (50 % Reduktion) (Palit et al. 2021).

Aufgrund dieser Wirkungsweise wurde im August 2020 eine klinische Studie über die Wirkung von Silymarin bei der Behandlung von Patienten mit einer schwer verlaufenden COVID-19 Lungenerkrankung gestartet (Good Clinical Practice Network, Studiennummer: NCT04394208). Teil dieser Doppelblindstudie waren 50 schwer erkrankte, intensivmedizinisch betreute COVID-19-Pneumonie Patienten. Die Kontrollgruppe (25 Personen) enthielt neben der vom Gesundheitsministerium festgelegten Standardbehandlung ein Placebo. Die zweite Gruppe, bestehend aus 25 Personen, erhielten neben der Standardbehandlung eine orale Silymarin-Dosis von insgesamt 420 mg/Tag verteilt auf drei Dosen (Palit et al. 2021). Die klinischen Daten wurden nach Erstgabe der Droge bis zu 28 Tage gesammelt und bewertet. Die Studie endete am 28. Februar 2021. Aktuell (April 2021) liegen keine Studienergebnisse vor.

Eine weitere *in-silico* Studie von Pandit und Latha (2020 preprint Research square) sollte ebenfalls die potentielle antivirale Wirksamkeit von Silymarin für die Behandlung von

COVID-19 Infektionen nachweisen. Das SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) Virus enthält in seiner äußeren Membran ein S (Spike) Glykoprotein, das mit hoher Affinität an das Angiotensin-konvertierende Enzym-2 (ACE-2) binden kann (Mittal et al. 2020). ACE-2 ist ein Transmembranprotein in Pro- und Eukaryoten und wird unter anderem von Epithelzellen der Atemwege, Alveolarepithelzellen, vaskulären Endothelzellen und Makrophagen der Lunge exprimiert (Bader 2020). Nach der Bindung des Spike Glykoproteins an ACE-2 benutzt das SARS-CoV-2 Virus dieses Enzym als Rezeptor, um in die Zelle eines Wirtsorganismus einzudringen. Das S-Glykoprotein setzt sich aus einer aminoterminalen Untereinheit (S1-Domäne) und einer rezeptorbindenden Untereinheit (S2-Domäne) zusammen. Nach der Bindung des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle wird die S1-Domäne abgespalten. Durch die Freilegung der S2 Untereinheit erfolgt die Verschmelzung der Virushülle mit der Membran der Wirtszelle (Ueffing et al. 2020). Mittlerweile ist bekannt, dass an diesem Vorgang eine zweite Protease, nämlich die transmembrane Serinprotease-2 (TMPRSS2), beteiligt ist (Bader 2020). Sowohl das transmembrane ACE-2 als auch die TMPRSS2 werden nicht nur in menschlichen Lungenzellen, sondern auch in hohem Maße im Nasenepithel koexprimiert (Sungnak et al. 2020). Aus diesem Grund infiziert das Virus hauptsächlich das Respirationssystem (Akçakaya 2021).

Pandit und Latha (2020) erstellten für ihre Arbeit verschiedene 2D und 3D Modelle des Virus, der Proteine sowie chemischer und pflanzlicher Liganden. Verschiedene simulierte Komplexbildungen zwischen dem Virus Spike-S Protein, ACE-2, TMPRSS2 und dem Silybin ergaben starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Silybin und der TMPRSS2 (Palit et al. 2021). Das Silybin wies eine höhere Bindungsenergie auf als das weit verbreitete Hydroxychloroquin, welches für die Behandlung von COVID-19 Infektionen eingesetzt wurde. Die durchgeführte *in silico*-Studie legt daher nahe, dass Silybin-haltige Heilpflanzenextrakte, ein wirksames, alternatives Therapeutikum sein könnten (Pandit und Latha 2020).

2. Pflanzlicher Sekundärstoffwechsel

Stoffe und Verbindungen, die nicht essentiell für das Wachstum und die Entwicklung des Organismus sind, jedoch unentbehrlich für die Existenz und den Fortbestand ihrer Art, werden als Sekundärmetabolite bezeichnet (Sticher 2010).

Diese Stoffwechselprodukte besitzen vielfältige biologische Eigenschaften und treten häufig in einer großen Strukturvariabilität auf. Sekundäre Pflanzenstoffe dienen z.B. dem Anlocken von Insekten durch Duft- oder Farbstoffe, der chemischen Abwehr oder dem Schutz vor biotischem und abiotischem Stress (Munk 2008). Ihre Synthese erfolgt in der Pflanze häufig nur während bestimmter Entwicklungsstadien und kann darüber hinaus auf bestimmte Pflanzenstrukturen begrenzt sein.

Ihre Entstehung wird unter dem Begriff Sekundärstoffwechsel zusammengefasst und leitet sich von Intermediaten, Kohlenhydraten oder Aminosäuren aus dem primären Stoffwechsel ab. Sowohl der Primär- als auch der Sekundärstoffwechsel bilden ein multidimensionales, metabolisches Netzwerk. Sie besitzen nicht nur gemeinsame Reaktionsschritte, sondern nutzen auch häufig ähnliche Enzymsysteme (Sticher 2010). Des Weiteren besitzen manche Stoffwechselprodukte typische Funktionen aus dem Primärstoffwechsel (Wachstum und Entwicklung) als auch aus dem Sekundärstoffwechsel. Die Vielzahl pflanzlicher Sekundärmetabolite lässt sich aufgrund ihrer Biosynthese-Grundbausteine in verschiedene Gruppen unterteilen. Die am häufigsten auftretenden Strukturgruppen stellen die Phenole, Terpenoide und Alkaloide dar (Bernards 2010).

2.1 Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel

Charakteristisch für die phenolischen Verbindungen sind die an einen aromatischen Ring verknüpften OH-Gruppen sowie daran substituierte Gruppen. Phenole können durch verschiedene Stoffwechselwege synthetisiert werden. Einer der bedeutsamsten ist der Shikimatweg. Die Synthese der phenolischen Sekundärverbindungen geht hauptsächlich von der Aminosäure Phenylalanin und in geringerem Maße von Tyrosin aus (Abb. 6). Diese Aminosäuren werden bei Pflanzen im Shikimatweg aus Arogenat gebildet. Nach der Abspaltung von Wasser und einer Decarboxylierung entsteht Phenylalanin. Wird das Arogenat zunächst durch $NADP^+$ oxidiert und gleichzeitig decarboxyliert, so entsteht Tyrosin (Heldt und Piechulla 2015).

Durch das Enzym Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) wird im ersten Schritt die Aminosäure Phenylalanin durch eine nicht-oxidative Desaminierung zu *trans*-Zimtsäure umgesetzt (Bernards 2010). Anschließend wird durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) die 4-Cumarsäure unter Zuhilfenahme von O_2 und $NADPH_2$ gebildet. Im letzten Schritt des allgemeinen Stoffwechselweges wird durch die 4-Cumarat Coenzym A Ligase (4CL) der Coenzym A Thioester 4-Cumaroyl-CoA synthetisiert (Ferrer et al. 2008). Zimtsäurederivate, wie z.B. die 4-Cumarsäure, spielen im Phenylpropanstoffwechsel eine sehr wichtige Rolle. Über verschiedene Biosyntheseschritte können weitere Substitutionen am aromatischen Ring entstehen. Aus diesen Substanzen entstehen weitere Sekundärmetabolite, wie z.B. die Cumarine, Flavonoide, Zimtalkohole sowie Phenolcarbonsäuren (Sticher 2010).

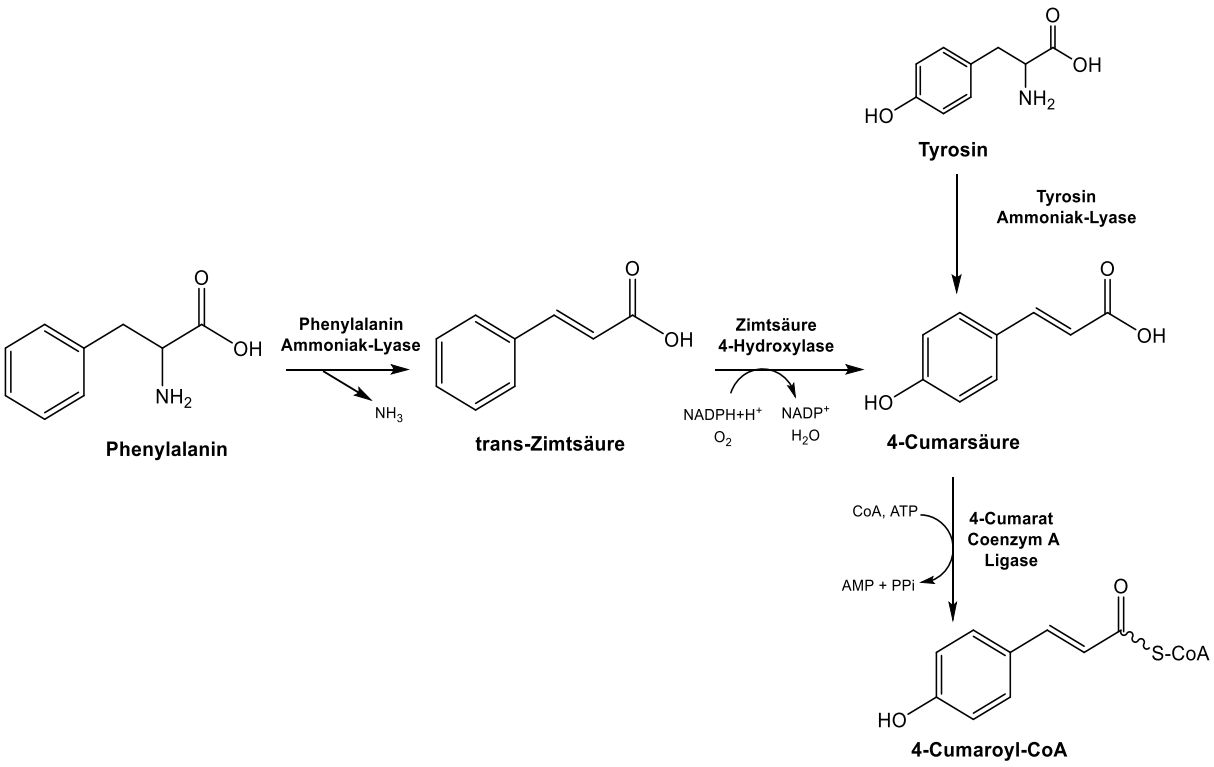


Abb. 6 Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel, ausgehend von Phenylalanin wird 4-Cumarsäure gebildet.

2.2 Monolignolsynthese (Coniferylalkohol)

Lignin ist eine der wichtigsten organischen Substanzen in der Natur und ist ein Bestandteil von pflanzlichen Zellwänden (Munk 2009). Die monomeren Bausteine des Lignins sind Monolignole, z.B. 4-Cumaryl-, Coniferylalkohol oder Sinapylalkohol, die aus Zimtsäurederivaten gebildet werden (Strasburger et al. 2014).

Die Biosynthese (Abb. 7) startet mit der Übertragung des 4-Cumarsäurerests aus 4-Cumaroyl-CoA auf die Shikimisäure durch eine Hydroxycinnamoyltransferase (HCT). Das Produkt 4-Cumaroylshikimisäure wird anschließend durch eine Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP98) zu Caffeoylshikimisäure hydroxyliert. Anschließend katalysieren die Hydroxycinnamoyltransferase (HCT) oder eine Esterase die Reaktion der Caffeoylshikimisäure zu den zwei Produkten Caffeoyl-CoA bzw. Kaffeesäure und Shikimisäure. Im nächsten Schritt wird das Feruloyl-CoA durch die Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferase (CCoAOMT) gebildet. Im weiteren Verlauf wird durch die Cinnamoyl-Coenzym A Reduktase (CCR) das Feruloyl-CoA mit Hilfe von $NADPH_2$ zu Coniferaldehyd reduziert (Ferrer et al. 2008). Im letzten Schritt bildet die Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD) mit $NADPH_2$ aus dem Coniferaldehyd den Coniferylalkohol.

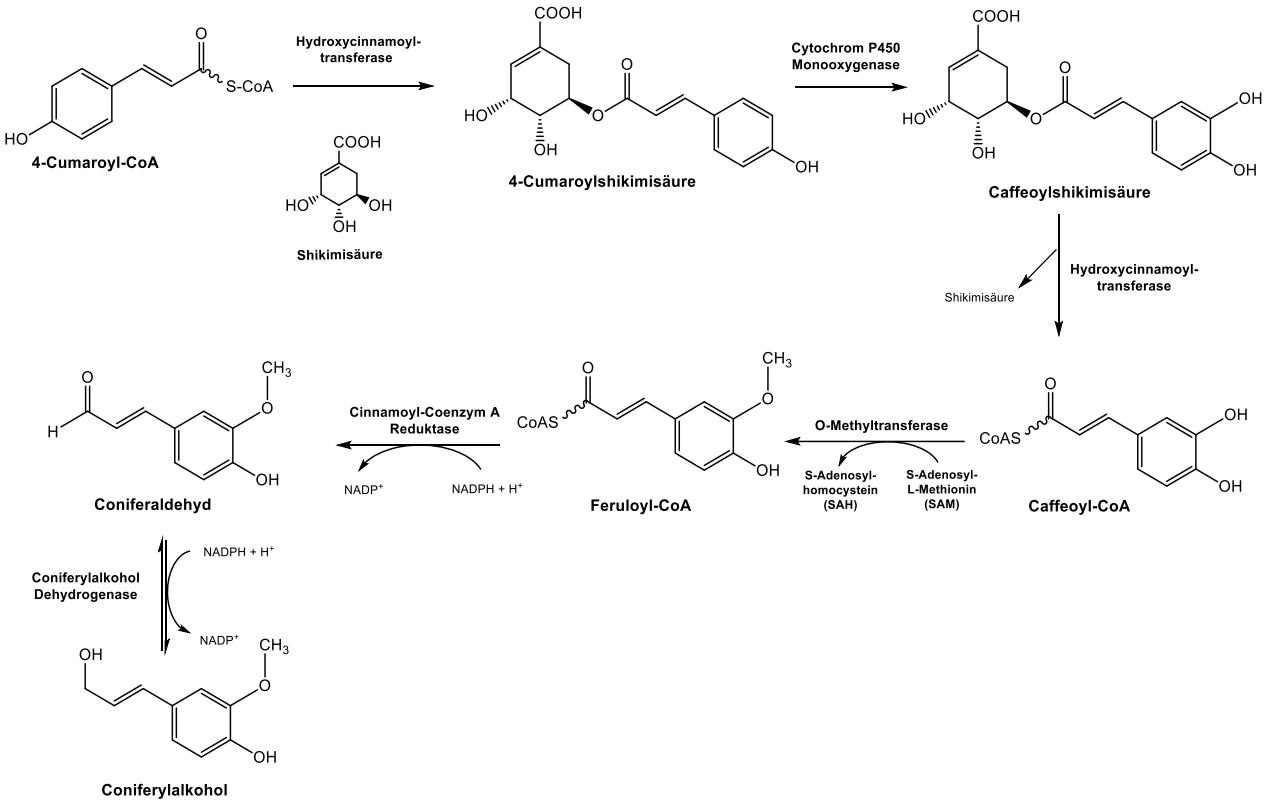


Abb. 7 Monolignolbiosynthese: ausgehend von 4-Cumarsäure zum Coniferylalkohol

2.3 Flavonoidbiosynthese (Taxifolin)

Die Flavonoidbiosynthese beginnt analog zur Monolignolsynthese beim 4-Cumaroyl-CoA. Im ersten Schritt wird durch die Chalkonsynthase (CHS) das Naringenin-Chalkon aus 4-Cumaroyl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA gebildet (Gad et al. 2021). Bei dieser Reaktion werden 3 CO_2 und 4 Coenzym A freigesetzt. Das Naringenin-Chalkon, wandelt sich anschließend entweder spontan oder mithilfe der Chalkonisomerase (CHI) zu Naringenin um (Abb. 8). Danach wird das Naringenin durch die Flavanon 3-Hydroxylase (F3H) unter Zuhilfenahme von O_2 und 2-Oxoglutarat zu Dihydrokaempferol umgewandelt. Dabei werden CO_2 und Succinat freigesetzt. Im letzten Schritt wird das Taxifolin durch die Flavonoid 3´-Hydroxylase (F3`H) gebildet (Bernards 2010).

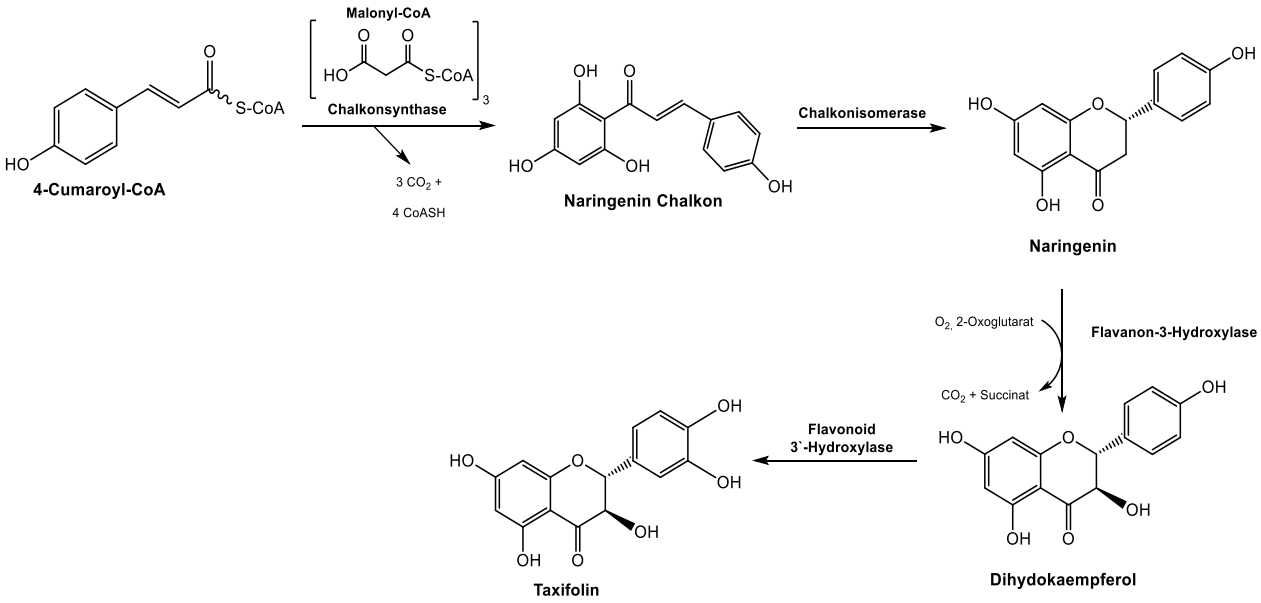


Abb. 8 Flavonoidsynthese: ausgehend von 4-Cumaroyl-CoA hin zum Taxifolin.

2.4 Silymarin-Biosynthese

Silymarin ist, wie bereits erwähnt, ein Gemisch aus Flavanonolderivaten aus mehreren Regioisomeren und Diastereomeren. Sie entstehen alle durch eine oxidative Kopplung zwischen einem Flavonoid (Taxifolin) und einem Phenylpropanoid (Coniferylalkohol). Dieser oxidative Prozess wird möglicherweise durch Peroxidasen (Einleitung, Kapitel 3) oder Laccasen katalysiert (Poppe und Petersen 2016, Bijak 2017).

Im ersten Schritt werden beide Komponenten unabhängig voneinander durch eine Ein-Elektron-Oxidation oxidiert, wobei zwei semistabile Radikale entstehen. Das Coniferylalkohol-Radikal kann über das gesamte konjugierte aromatische Ringsystem dieser Einheit hinweg delokalisieren, während das Taxifolin-Radikal auf die beiden Hydroxygruppen am aromatischen Ring beschränkt ist. (Abb. 9). Die anschließende Kopplung des Coniferylalkohols mit dem Taxifolin erfolgt über einen von freien Radikalen vermittelten Prozess (Bernards 2010). Je nachdem, an welcher Position die Ausgangssubstanzen oxidiert wurden, können alternative Kopplungsprodukte zwischen den Molekülen entstehen.

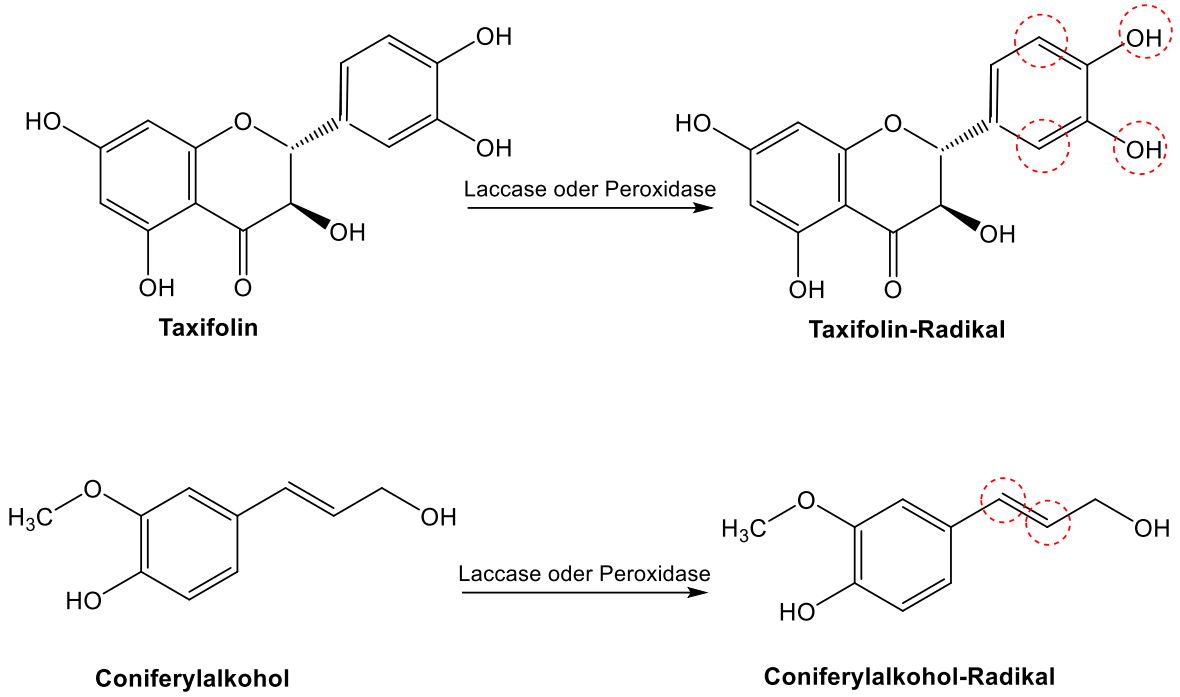


Abb. 9 Darstellung der Ein-Elektron-Oxidation von Taxifolin und Coniferylalkohol. Das Elektron kann an unterschiedlichen Stellen entfernt werden (rote, gestrichelte Kreise).

Geringfügige Strukturmodifikation während der Kopplungsreaktion oder der abschließenden nukleophilen Ringschließung führen zu weiteren Flavonolignanderivaten (Abb. 5). Der genaue Mechanismus ist jedoch nach wie vor unbekannt, denn weder Laccasen, noch die Peroxidasen sind in der Lage die Regio- oder Stereospezifität der Flavonolignanderivate selbst zu steuern. Es wird vermutet, dass weitere Enzyme, sogenannte Dirigierende Proteine (Einleitung, Kapitel 5), an diesem Mechanismus beteiligt sind (Davin et al. 1997).

3. Peroxidasen

Peroxidasen (EC 1.11.1.7) katalysieren die Oxidation von organischen Verbindungen in Gegenwart eines Elektronenakzeptors wie zum Beispiel H_2O_2. Pflanzen besitzen eine große Anzahl an Peroxidase-Isoenzymen, die sich in ihrer Aminosäuresequenz um mehr als 50 % unterscheiden können (Welinder 1992). Diese Enzyme könnten auch an der oxidativen Kopplung eines Flavonoids (Taxifolin) und eines Phenylpropanoids (Coniferylalkohol) beteiligt sein (Einleitung, Kapitel 2.4). Im Jahr 2017 gelang es Dr. Poppe im Rahmen seiner Dissertation, ein Peroxidase-Gen aus der Mariendistel zu identifizieren. Das Enzym besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 34 kDa und mehrere konservierte Sequenzabschnitte einer sekretorischen Peroxidase sowie die charakteristische Signatur eines Häm-Liganden. Des Weiteren gelang es, eine sekretorische Peroxidase mit einem Molekulargewicht von 45 kDa durch chromatographische Trennverfahren zu isolieren (Poppe 2017). Eine rekombinante Expression war nicht erfolgreich.

Sekretorische Typ III Peroxidasen besitzen in der Regel ein Molekulargewicht zwischen 30 und 45 kDa und enthalten als prosthetische Gruppe Protohaemin IX (Häm b), sowie zwei Ca^{2+} Ionen (Almagro et al. 2008). Diese Enzyme sind glykosidiert und sind in Vakuolen und Zellwänden lokalisiert (Passardi et al. 2005). Viele pflanzliche Peroxidasen besitzen eine Signalpeptidsequenz für das Endoplasmatische Retikulum (Welinder 1992).

4. Laccasen

Die Laccasen (LACC, EC 1.10.3.2) sind extrazelluläre Glykoproteine. Sie gehören zur Familie der Multikupferoxidasen und enthalten vier Kupfer-Ionen. Abhängig von ihren spektroskopischen Eigenschaften klassifiziert man sie als T1, T2 oder T3 Enzyme (Wang et al. 2016). Laccasen wurden erstmals im Jahr 1883 aus dem Lack-Baum (*Rhus vernicifera*) isoliert (Reinhammar 1969). Das Enzym katalysiert sowohl anabole (Aufbau), als auch katabole (Abbau) Reaktionen (Janusz et al. 2020). Monolignole polymerisieren extrazellulär nach Radikalisierung, möglicherweise durch Laccasen, zu Lignin. Das Enzym katalysiert ebenfalls die Oxidation von organischen Verbindungen in Gegenwart eines Elektronenakzeptors. Im Gegensatz zu den Peroxidasen nutzen Laccasen jedoch molekularen Sauerstoff (Poppe 2017). Laccasen sind weit verbreitet und kommen in Pflanzen, Pilzen, Bakterien, Cyanobakterien und in Insekten vor (Brijwani et al. 2010, Palanisami und Lakshmanan 2011, Dittmer und Kanost 2010).

Ebenfalls gelang es Dr. Poppe eine Laccase aus der Mariendistel zu identifizieren. Das Enzym besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 63,4 kDa. Strukturanalysen ergaben eine Zugehörigkeit zur Cupredoxin-Familie. Auch hier war eine rekombinante Expression leider nicht erfolgreich. Laccasen wie zum Beispiel aus dem Schimmelpilz (*Aspergillus flavus*) und dem Austern-Seitling (*Pleurotus ostreatus*) besitzen ebenfalls Proteingrößen zwischen 60 kDa und 67 kDa. (Gomaa et al. 2014, Palmieri et al. 1997).

5. Dirigierende Proteine

Vor der Entdeckung der Dirigierenden Proteine im Jahr 1995 wurde angenommen, dass die Lignin- und Lignanbiosynthese zufällig und nur durch die oxidativen Enzyme (wie z.B. Laccasen und Peroxidasen) erfolgt (Davin und Lewis 2000). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass weder Laccasen, noch Peroxidasen oder vergleichbare Oxidasen in der Lage sind, regio- und stereospezifische Reaktionen selbstständig zu kontrollieren.

1995 bestätigte die Arbeitsgruppe um Davin und Lewis das Vorkommen von Dirigierenden Proteinen ohne eigene katalytische Aktivität. Dieses Protein, isoliert aus der Hänge-Forsythie (*Forsythia suspensa*), hat ein Molekulargewicht von 78 kDa (Davin et al. 1997). Aktuell ist die Beteiligung der Dirigierenden Proteine bei der bi-molekularen Kopplung von Coniferylalkohol

Radikalen zu (+)- oder (-)-Pinoresinol in der Lignan-Biosynthese bekannt (Effenberger et al. 2015, Pickel und Schaller 2013) (Abb. 10).
Die erste 3D Strukturanalyse eines Dirigierenden Proteins ergab eine trimere Proteinstruktur (Kim et al. 2012). Das Molekulargewicht eines Monomers beträgt zwischen 20 kDa und 40 kDa. Die Proteinsequenzen der DIRs weisen mehrere *N*-Glykosylierungs-Erkennungssequenzen (Asparagin-X-Serin/Threonin) auf. Tatsächlich wurde bei dem Dirigierenden Protein aus *Arabidopsis thaliana* eine Paucimannose-Glykosylierung nachgewiesen (Pickel et al. 2012). Paucimannose ist ein mannosidisches *N*-Glykan mit einer $Mannose_{1-4}Fucose_{0-1}N\text{-}Acetylglucosamin_2$ Zusammensetzung.

Alle bisher charakterisierten Dirigierenden Proteine sind an der Lignanbiosynthese involviert. Effenberger et al. (2015) beschrieb in ihrer Arbeit jedoch auch ein Dirigierendes Protein, welches an der Gossypol-Biosynthese in Baumwolle (*Gossypium* sp.) beteiligt ist. Da der Reaktionsmechanismus zwischen dem Taxifolin und Coniferylalkohol in der Silymarin Synthese (Einleitung, Kapitel 2.4) auf ähnliche Weise wie bei der Gossypol-Biosynthese ablaufen könnte, liegt die Vermutung nahe, dass auch Dirigierende Proteine aus der Mariendistel an der Reaktion beteiligt sein könnten (Poppe 2017).

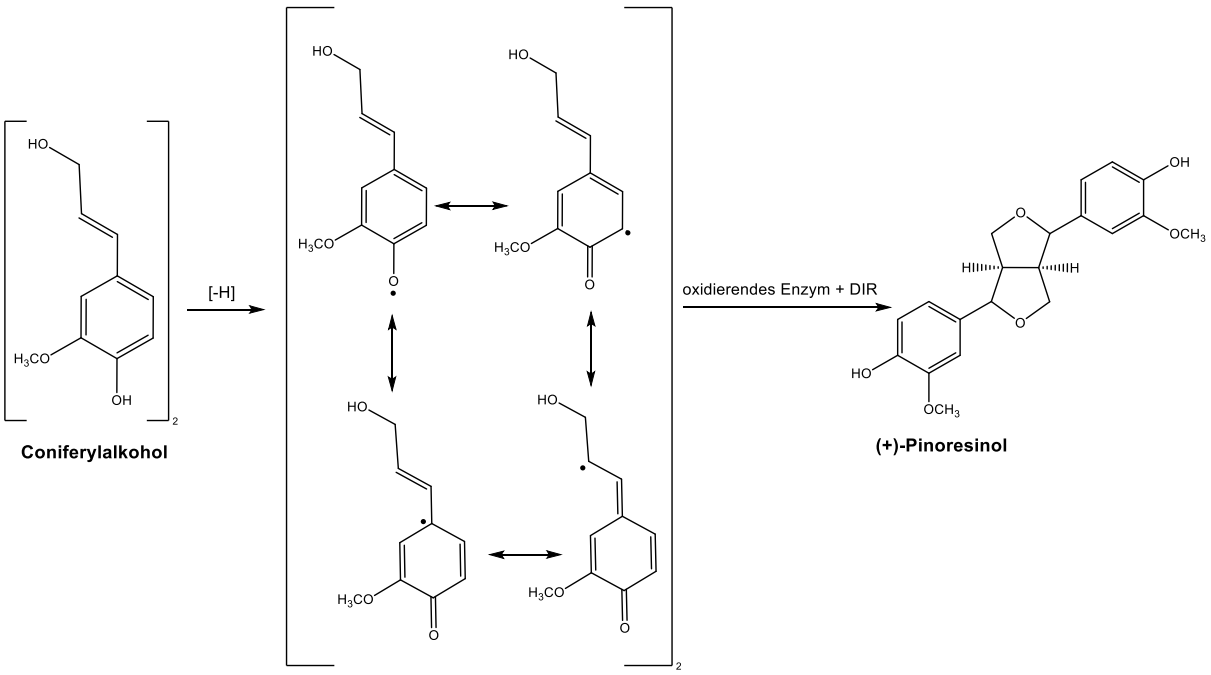


Abb. 10 Oxidative Verknüpfung von zwei Coniferylalkohol-Molekülen zu Pinoresinol.

6. Phenylalanin Ammoniak-Lyase

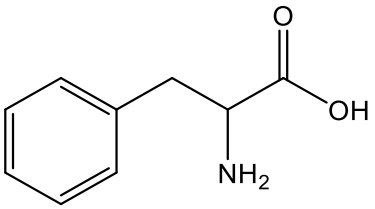
Die Phenylalanin Ammoniak-Lyase, PAL (EC 4.3.1.5) ist das zentrale Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Phenylpropanen und wurde bereits ausgiebig in vielen Pflanzen (Hyun et al. 2011), Pilzen und Mikroorganismen charakterisiert (Bezanson et al. 1970, Williams et al. 2005).

Das Enzym katalysiert eine nicht oxidative Desaminierung des Phenylalanins zu *trans*-Zimtsäure. Für die Abspaltung des NH_3 wird jedoch eine elektrophile Gruppe benötigt, die das Substrat (L-Phenylalanin) selbst nicht zur Verfügung stellen kann. In der Regel werden solche elektrophilen Gruppen durch einen Kofaktor bereitgestellt. Da die PAL jedoch keine Kofaktoren für die enzymatische Umsetzung benötigt, muss die Bereitstellung aus dem Enzym selbst kommen. Tatsächlich kann die PAL seine elektrophile prosthetische Gruppe autokatalytisch aus seinem eigenen Polypeptid bilden (Ritter und Schulz 2004). Innerhalb der PAL-Proteinsequenz befindet sich eine Ala-Ser-Gly Tripeptidsequenz. Durch eine posttranslationale Dehydratisierung entsteht der sogenannte 4-Methyliden-imidazol-5-on (MIO)-Komplex. Teil dieses MIO Komplexes ist ein Dehydroalanin, welches aus dem Serin der Tripeptidsequenz gebildet wird (Schwede et al. 1999). An die Doppelbindung des Dehydroalanins kann das abgespaltete NH_3 binden.

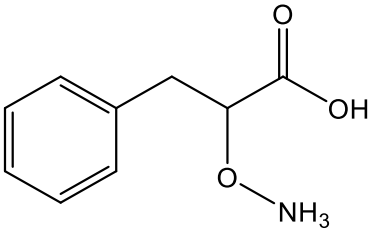
Nach der Abspaltung des Ammoniaks wird eine Kohlenstoffdoppelbindung gebildet und es entsteht die *trans*-Zimtsäure. Zimtsäure und ihre Derivate spielen eine wichtige Rolle im Phenolstoffwechsel (Einleitung, Kapitel 2.1).

In den Mikroorganismen *Streptomyces maritimus* (Bezanson et al. 1970), *Streptomyces verticillatus* (Xiang et al. 2002) und *Photorhabdus luminescens* (Williams et al. 2005) werden die nachgewiesenen Phenylalanin Ammoniak-Lyasen mit der Biosynthese der Sekundärmetabolite Enterocin und 3,5-Dihydroxy-4-Isopropylstilben in Zusammenhang gebracht. Darüber hinaus wurden zwei PAL Enzyme aus den Cyanobakterien *Nostoc punctiforme* und *Anabaena variabilis* charakterisiert (Moffitt et al. 2007).

Die PAL wird durch ihr eigenes Produkt, die *trans*-Zimtsäure, gehemmt. Ein weiterer, sehr starker Aktivitätshemmer ist das Phenylalanin-Analogon 2-Aminooxy-3-Phenylpropansäure (Abb. 11) (Havir 1981; Heldt und Piechulla 2015). Diese Substanz ist in der Lage, das PAL Enzym bereits mit mikromolaren Konzentrationen zu hemmen.



Phenylalanin



2-Aminooxy-2-Phenylpropansäure

Abb. 11 Darstellung der strukturellen Unterschiede von Phenylalanin und 2-Aminooxy-2-Phenylpropansäure.

Mehrere Studien an diversen PAL Enzymen legen nahe, dass dieses Enzym neben Phenylalanin noch weitere Moleküle als Substrate umsetzen kann. Rösler et al. (1997) berichtete bereits, dass einige PAL Enzyme aus Monokotyledonen wie z.B. dem Mais (*Zea mays*) neben Phenylalanin auch Tyrosin enzymatisch umzusetzen können, wohingegen Dikotyledonen nur Phenylalanin umsetzen (Jun et al. 2018). Neben der Phenylalanin Ammoniak-Lyase gibt es noch die sogenannte Tyrosin Ammoniak-Lyase (TAL, EC 4.3.1.25). Die TAL katalysiert die enzymatische Umsetzung von Tyrosin zu 4-Cumarsäure (Abb. 6). Im Phenylpropanstoffwechsel wird diese durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) aus *trans*-Zimtsäure gebildet. Enzyme, die eine duale Spezifität für L-Phenylalanin und L-Tyrosin aufweisen, werden als Phenylalanin/Tyrosin Ammoniak-Lyasen (PTAL EC 4.3.1.26) bezeichnet (Xue et al. 2007). Diese Enzyme kommen zum Beispiel in Mikroorganismen, Hefen und monokotylen Pflanzen vor und zeigen PAL/TAL-Aktivitätsverhältnisse zwischen 0,2 und 6. Darüber hinaus können PTALs auch die α-Aminosäure L-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) desaminieren. Hierbei entsteht Kaffeesäure (Jun et al. 2018).

Neben der PAL und TAL existiert in der Natur noch eine weitere wichtige Ammoniak-Lyase, die Histidin Ammoniak-Lyase (HAL, EC 4.3.1.3). Dieses Enzym, welches auch unter dem Namen Histidase bekannt ist, wurde in Prokaryoten und Tieren nachgewiesen und spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel für den Histidinabbau (Wu et al. 2014). Darüber hinaus konnte das Enzym in den einzelligen Grünalgen *Dunaliella tertiolecta* und *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen werden (Hellio und Legal 1999, Hellio et al. 2004). Auch in der Ackerbohne (*Vicia faba*) wurde eine HAL nachgewiesen (Kamel und Maksoud 1978). Jedoch sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass die beschriebene enzymatische Aktivität äußerst gering war. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Enzym um eine PAL oder TAL, die neben Phenylalanin und/oder Tyrosin ebenfalls L-Histidin als Substrat umsetzen kann.

Trotz großer Unterschiede in den Aminosäuresequenzen aller drei Ammoniak-Lyasen, entwickelte sich die PAL vermutlich aus der HAL (McDonald et al. 2007 aus Wu et al. 2014). Aktuelle phylogenetische Studien deuten darauf hin, dass Ammoniak-Lyasen durch

horizontalen Gentransfer aus Bakterien auf eine frühe Pilzlinie übertragen wurden und anschließend über arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiosen auf Landpflanzen weitergegeben wurden (Emiliani et al. 2009, Barros und Dixon 2020).

6.1 Therapeutische Anwendung - das Medikament Pegvalinase

Pegvalinase ist ein Medikament, dass für die Behandlung von genetisch bedingter Phenylketonurie (PKU) eingesetzt wird. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbbare Stoffwechselkrankheit (Kröner und Koletzko 2010), die unbemerkt und unbehandelt sehr schwere Verläufe aufweist. Im menschlichen Organismus wird Phenylalanin durch die Phenylalaninhydroxylase (PAH) in Tyrosin umgewandelt bzw. abgebaut. Bei der klassischen Form der PKU (98 % der Fälle) ist die Wirkung des Enzyms entweder sehr stark eingeschränkt oder nicht vorhanden (Karges und Wagner 2017). Aufgrund des Enzymmangels sammelt sich zunehmend die Aminosäure Phenylalanin im Körper an. Dies führt zu einer kompetitiven Hemmung des Blut-Hirn-Schranke-Transporters für weitere wichtige Aminosäuren wie z.B. Tyrosin, Valin oder Isoleucin. Ein Mangel dieser Aminosäuren führt zu einer reduzierten Proteinbiosynthese und folglich zu einer Unterernährung im Gehirn (Schulz 2015). Infolgedessen kommt es unter anderem zu einer Mikrozephalie mit irreversibler geistiger Behinderung und Hirnschädigung, krampfartige Spasmen, Nervenzellschädigungen und motorische Ausfälle. Bei der atypisch verlaufenden Form (2 % der Fälle) ist die Funktion des Koenzyms Tetrahydrobiopterin eingeschränkt (Kröner und Koletzko 2010). Dieses Koenzym ist unter anderem für die Herstellung der Botenstoffe Dopamin und Serotonin von essentieller Wichtigkeit. Im Säuglings- und Kleinkindalter kann die PKU nur durch eine strenge, sehr spezielle Diät behandelt werden (Karges und Wagner 2017).

Eine alternative Behandlungsmöglichkeit für Menschen ab 16 Jahre bietet das Medikament Pegvalinase. Hierbei handelt es sich um eine rekombinant hergestellte Phenylalanin Ammoniak-Lyase aus dem Cyanobakterium *Anabaena variabilis* (Gelbe Liste Online, Vidal MMI Germany GmbH). Pegvalinase ist ein kovalentes Konjugat aus der PAL und NHS-Methoxypolyethylenglycol (NHS-PEG). Es trägt den Markennamen Palynziq und ist auf dem deutschen Markt in Form von Fertigspritzen für die subkutane Injektion zugelassen. Die empfohlene Anfangsdosis beträgt wöchentlich 2,5 mg für 4 Wochen. Im weiteren Verlauf wird die Dosis langsam erhöht, bis schließlich eine einmalige Dosis von maximal 60 mg täglich erreicht wurde. Die Vergabe des Medikamentes richtet sich nach dem gewünschten Phenylalaninspiegel im Blut des Patienten.

Pegvalinase wird hauptsächlich durch immunvermittelte Mechanismen aus dem Kreislauf eliminiert. Aus diesem Grund muss die Dosissteigerung langsam erfolgen, da sehr häufig akute systemische Überempfindlichkeitsreaktionen bei den Patienten auftreten (Clinical Trials

Arena, Progressive Digital Media Group London, www.clinicaltrialsarena.com). Diese Nebenwirkungen traten unabhängig von Geschlecht, Alter und Körpergewicht der Probanden auf. In klinischen Studien wurden IgG- und IgM-Antikörper gegen die PAL und das PEG nachgewiesen. Die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) empfiehlt den Patienten vor der Anwendung des Medikamentes eine Prämedikation in Form eines H1- und H2-Rezeptor-Antagonisten und einer antipyretischen Medikation. Darüber hinaus sollten die Patienten aus ihrer Sicht dazu angewiesen werden, während der Behandlung mit Palynziq stets ein Adrenalin-Injektionsgerät bei sich zu tragen.

7. Chalkonsynthase

Die Farbe der Blüten ist eines der wichtigsten Merkmale einer Pflanze. Verantwortlich für die rosafarbenen, roten, violetten oder purpurnen Farben sind die Anthocyane (Liu et al. 2021). Die Chalkonsynthase (CHS; EC 2.3.1.74) ist das erste Schlüsselenzym des Flavonoid-Biosyntheseweges. Wird die CHS-Transkription in der Pflanze reduziert, so wird die Blütenpigmentierung gehemmt. Dies führt zu veränderten Blütenphänotypen, die von kleinen weißen Streifen bis zu komplett weißen Blüten reichen (Liu et al. 2021).

Die CHS besitzt eine Sequenzhomologie zu mehreren Polyketidsynthasen, zu denen auch die Stilbensynthasen (STS; EC 2.3.1.95) zählen (Ferrer et al. 1999). Sowohl die CHS, als auch die STS verknüpfen 3 Acetat-Einheiten aus 3 Malonyl-CoA Molekülen mit 4-Cumarsäure (aus 4-Cumaroyl-CoA) unter der Bildung zwei verschiedener Produkte.
Die Chalkonsynthase bildet das Naringenin-Chalkon unter der Freisetzung von 3 CO_2 und 4 Coenzym A (Einleitung, Kapitel 2.3). Die Stilbensynthase bildet dagegen das Resveratrol. Bisher wurden mehrere CHS-Gene aus monokotylen, dikotylen und einigen gymnospermen Arten kloniert und charakterisiert (Pang et al. 2005). Jedoch wurden auch CHS-ähnliche Enzyme in Bakterien identifiziert. Diese besitzen eine maximale Sequenzhomologie von 25-50 % zu den pflanzlichen Enzymen (Austin und Noel 2002).
Die CHS-Aktivität wird besonders durch endogene Mechanismen, wie zum Beispiel die Blütenentwicklung, niedrige Temperaturen (Leyva et al. 1995), UV-Bestrahlung (Zhou et al. 2007), Verwundung (Richard et al. 2000) oder Pathogenbefall (Soylu 2006, Christensen et al. 1998) bei der Pflanze beeinflusst.

8. Cinnamoyl-CoA Reduktase

Die Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR; EC 1.2.1.44) ist das erste Enzym welches Phenylpropanoid-Metabolite in den Monolignol-Weg leitet (Lüderitz and Grisebach 1981). Es katalysiert die Umwandlung von 4-Cumaroyl-, Feruloyl- und Sinapoyl-CoA mit Hilfe von $NADPH_2$ zu 4-Cumaraldehyd, Coniferaldehyd und Sinapaldehyd (Vanholme et al. 2010). Die Substrataffinität und -präferenz variiert jedoch zwischen den einzelnen Pflanzenarten, den CCR-Isoformen und auch innerhalb der gleichen Spezies.

Die Cinnamoyl CoA Reduktase bildet einen wichtigen Kontrollpunkt bei der Regulierung des Kohlenstoffflusses in der Lignin-Biosynthese (Chao 2017). Wird das Enzym herunterreguliert, so führt dies zu einem verringertem Ligningehalt und einer Veränderung der Ligninzusammensetzung. Dadurch kann sich der Phänotyp des Organismus verändern. Pappeln mit einem herunterregulierten CCR-Gehalt besitzen eine orange bis weinrote Färbung des Xylems und oft einen fleckigen Stamm (Van Acker et al. 2014). Diese ausgeprägte Färbung hängt mit dem Einbau von geringen Mengen an Ferulasäure in das Polymer zusammen (Leplé et al. 2007).

Des Weiteren spielt das Enzym eine wichtige Rolle in der Pflanzenentwicklung und in Abwehrreaktionen bei auftretendem Umweltstress (Hua et al. 2014; Kawasaki et al. 2006; Ma 2007).

9. Coniferylalkohol Dehydrogenase

Die Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD, EC 1.1.1.195) wurde zunächst in der Sojabohne (*Glycine max*) (Ebel und Grisebach 1973) und später in vielen anderen Pflanzenarten identifiziert und biochemisch charakterisiert. Im letzten Schritt des Monolignol-Biosyntheseweges bildet die CAD aus Coniferaldehyd Coniferylalkohol. Die CAD ist sowohl $NADPH_2$- als auch Zn^{2+}-abhängig und eng verwandt mit den Mitgliedern aus der Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR) (Pan et al. 2014).

Durch den vermehrten Einsatz von Genom-Analysen konnten mehrere CAD-Gene in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen werden. Unter anderem konnten in *Arabidopsis thaliana* 17 CAD-Homologe annotiert werden (Kim et al. 2004). Eine biochemische Charakterisierung von zwei dieser Enzyme zeigte, dass sie nicht nur eine wichtige Rolle bei der Bildung von Coniferyl- bzw. Sinapylalkoholen spielen, sondern auch bei der Bildung von G- bzw. S-Ligninen (Sibout et al. 2005).

Auch die Reduktion der CAD-Aktivität führt zu einer strukturellen Modifikation des Lignins. Besonders in holzigen Arten kommt es zum vermehrten Einbau von Sinapaldehyd-Einheiten (van Acker et al. 2017). Wird die Coniferylalkohol Dehydrogenase unterdrückt, führt dies zu einer Veränderung des Lignins. Es kommt zu einer erhöhten Zahl an freien phenolischen

Gruppen im Lignin, die besonders unter alkalischen Bedingungen die Reaktivität des Lignins erhöhen. Dieser Vorgang verbessert den Ligninabbau (Nabuqi et al. 2020).

10. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, mehrere zentrale Schlüsselenzyme aus den unterschiedlichen Biosynthesewegen zu Komponenten des Silymarins zu charakterisieren. Hierbei handelte es sich um die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel, die Chalkonsynthase (CHS) aus dem Flavonoidsyntheseweg, die Cinnamoyl-Coenzym A Reduktase (CCR) und die Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD) aus dem Monolignolsyntheseweg, sowie die Peroxidase (POD) und Dirigierende Proteine (DIR) aus der Silymarin-Biosynthese.

Für die Untersuchung wurden zunächst molekularbiologische Methoden angewendet. Nach der erfolgreichen Identifizierung aller codierenden Gensequenzen konnte eine rekombinante Proteinexpression aller ausgewählten Enzyme durchgeführt werden. Im weiteren Verlauf wurden diese proteinbiochemisch untersucht. Diese spezielle Charakterisierung umfasste unter anderem die Bestimmung wichtiger Enzymparameter wie die K_m-Werte für alle Hauptsubstrate. Diese Substrate mussten teilweise zunächst synthetisiert werden. Darüber hinaus wurden weitere wichtige Parameter wie zum Beispiel Temperatur- und pH-Optimum ermittelt. Diese Daten dienen zur Gewinnung eines besseren Verständnisses des Stoffwechsels der Mariendistel.

Aufgrund einer *N*-Glykosylierung der Peroxidase sowie einer starken Paucimannose-*N*-Glykosylierung der dirigierenden Proteine, welche für die Löslichkeit und enzymatische Aktivität essentiell ist, ist eine rekombinante Expression in herkömmlichen Systemen äußerst schwierig. Aus diesem Grund sollten aktuelle Systeme miteinander verglichen werden. Die nachfolgende Evaluierung und Etablierung eines zuverlässig funktionierenden Expressionssystems, wie zum Beispiel das GlycoSwitch® Hefesystem und das pflanzliche Expressionssystem, bildete ein weiteres Ziel dieser Promotionsarbeit.

III. Material und Methoden

A. Allgemeine Methoden

1. Pflanzenanzucht zur RNA- und DNA-Isolation

Silybum marianum Saatgut wurde aus dem Alten Botanischen Garten Marburg aus dem Freiland (Arzneipflanzenbeet) geerntet und anschließend in handelsüblicher Blumenerde ausgesät. Nach der Keimung und einem Pflanzenwachstum bis ca. 10 cm wurde die Pflanze mehrfach mit demineralisiertem Wasser und Ethanol gereinigt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C zwischengelagert.

2. Herstellung einer *Silybum marianum* Kalluskultur

Zuerst wurden Samen der Pflanze *Silybum marianum* nach dem folgenden Schema vorbehandelt:

96 % Ethanol	1 min
10 % (w/v) Chlorlösung	10 min
3x steriles Reinstwasser	je 5 min

Anschließend wurden jeweils drei Samen pro Petrischale auf MSOH (hormonfreies MS Medium; Murashige and Skoog, 1962) Festmediumplatten ausgelegt und im Dunkelraum bei Raumtemperatur für 2-3 Tage gelagert. Nachdem die Samen sterile Wurzeln ausgebildet hatten, wurden diese mit einem Skalpell in kleine Stücke zerschnitten und anschließend auf B5 Festmedium (Gamborg et al. 1968) ausgelegt. Im Verlauf von 2 bis 3 Wochen bildete sich an den Schnitträndern der Kallus aus, welcher erneut separiert und auf B5 Festmedium in Kulturgläsern ausgelegt wurde. Nachdem sich eine größere Menge Kallus gebildet hatte, wurden 5 g Kallus in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml B5 Flüssigmedium überführt und unter konstantem Schütteln (110 UpM) im Dunkeln bei 25 °C inkubiert.

2.1 Überimpfen und Aufrechterhaltung der Suspensionskultur

Das Überimpfen der Kultur fand einmal wöchentlich statt. Hierfür wurden 5 g Nassgewicht der Kultur in einen neuen Erlenmeyerkolben mit 50 ml B5 Kulturmedium überführt.

B. Proteinbiochemische Methoden

3. Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Der Proteingehalt wurde nach der von Bradford im Jahr 1976 entwickelten Methode bestimmt. Das Prinzip dieser Methode liegt in der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Durch diese Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption dient dabei als Maß für die Proteinkonzentration.

Für die Bestimmung des Proteingehalts wurden 10 µl Probenlösung mit 1000 µl Bradford Reagenz (siehe Bradford Reagenz; Anhang I, Kapitel 24.3) in einer Plastikküvette versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine Referenz mit Puffer anstelle von Probe gemessen. Als Berechnungsgrundlage diente eine Probe mit bekannter Proteinkonzentration (Rinderserumalbumin 1 mg ml^{-1}). Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

4. Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Für die Fällung wurden die Proben im gleichen Volumenverhältnis mit einer 40 %igen Trichloressigsäurelösung (TCA) versetzt. Die Proben wurden für 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 16000 x g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2x 500 µl eiskalter, 80 %iger (v/v) Acetonlösung gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das restliche Aceton in der Vakuumzentrifuge verdampft.

5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse unter denaturierenden Bedingungen. Vor dem Start der Elektrophorese wird den Proben das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzugefügt. Das Detergens entfaltet die Proteine und überdeckt die Eigenladung der Proteine und sorgt somit für eine konstante Ladungsverteilung. Zusätzlich werden die Proteinproben auf 95 °C erhitzt, damit die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Moleküle aufgebrochen werden. Durch die vorherige Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen (ß-Mercaptoethanol) werden die Disulfidbrücken aufgespalten. Die Trennung beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten der Proteine im Gel und ist von ihrer Größe sowie vom Vernetzungsgrad des Acrylamids abhängig. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch das Anlegen einer elektrischen Spannung. Die negativ geladenen Analyten wandern in Richtung Anode.

Durchführung

Die Gele für die Elektrophorese wurden nach dem folgenden Schema hergestellt und in einem Gelgießstand (BioRad) gegossen.

Trenngel:		Sammelgel:	
1,5 M Tris HCl (pH 8,8)	1250 µl	0,5 M Tris HCl (pH 6,8)	625 µl
Aqua dest.	1450 µl	Aqua dest.	1400 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %ig)	2050 µl	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %ig)	375 µl
SDS (10 % (w/v))	200 µl	SDS (10 % (w/v))	100 µl
TEMED	8 µl	TEMED	5 µl
APS (10 % (w/v))	35 µl	APS (10 % (w/v))	20 µl

Nach dem Polymerisieren wurden die Gele in der Elektrophoresekammer fixiert. Diese wurde anschließend mit 400 ml einfach verdünntem Laemmli Laufpuffer (pH 8,3: 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS) befüllt. Die Proben wurden mit dem Laemmli Probenpuffer (siehe Anhang I, Kapitel 24.5) verdünnt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Stromstärke betrug 30 mA pro Gel, und die Spannung wurde auf 220 V eingestellt. Der Lauf dauerte ca. 60 Minuten. Zur Identifizierung des Molekulargewichts wurde der Roti®Mark Tricolor Standard verwendet.

6. Western Blot

Der sogenannte Western Blot ist ein Verfahren, bei dem die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden. Diese Methode bietet nach dem Transfer die Möglichkeit, das Zielprotein mittels spezifischer Antikörper reagieren und durch die Zugabe von entsprechenden Substraten sichtbar werden zu lassen.

Nach der SDS-PAGE wurden das Gel und mehrere Lagen eines dünnen Filterpapiers für 10 min im Transferpuffer (25 mM Tris, 191 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert. Nachdem die PVDF Transfermembran passend zugeschnitten worden war, wurde diese zunächst für 15 s in 100 % Methanol und anschließend für weitere 2 min in demineralisiertem Wasser aktiviert. Danach wurde die Membran für 15 min im Transferpuffer inkubiert.

Als erstes wurden einige Lagen des Filterpapiers mittig auf die Anode des Semi-Dry Elektroblotters platziert. Anschließend wurde die Membran auf diese Schicht gelegt. Die Platzierung des SDS-Gels erfolgte nun passend und luftblasenfrei auf die Membran. Zuletzt wurden die übrigen Lagen des Filterpapiers über dem Gel platziert. Überschüssiger Puffer

wurde mit einem Papiertuch sorgfältig entfernt. Das Gerät wurde verschlossen, und es wurde ein Strom von 3,0 mA pro cm^2 Membran angelegt. Der Transfer dauerte 1,5 Stunden.

6.1 Inkubation mit Antikörpern

Nach dem Blotten wurde das SDS-Polyacrylamidgel vorsichtig von der Membran entfernt und zur Transferkontrolle mit der Coomassie Brilliant Blue Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 mit 45,5 % (v/v) Ethanol und 9,2 % (v/v) Essigsäure) angefärbt. Anschließend wurde das Gel zur Lokalisation der Banden entfärbt (30 % (v/v) Ethanol mit 10 % (v/v) Essigsäure). Die Membran wurde zunächst für 5 min mit TBS-T Puffer (10 mM Tris mit 0,9 % (w/v) NaCl und 0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Die Blockierung der Membran erfolgte über Nacht in 5 % Magermilchpulver gelöst in TBS-T Puffer.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran kurz mit TBS-T Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Anti-6xHis-Tag Antikörper (1:10000 in 1 % Milchpulver in TBS-T Puffer) zur Membran hinzugegeben und für 1 Stunde auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach dem erneuten Waschen der Membran in TBS-T Puffer wurde der zweite Antikörper (1:20000 goat anti mouse IgGFc alkaline phosphatase AP conjugate in TBS-T) hinzugegeben. Die Membran wurde erneut für 1 Stunde auf einem Wippschüttler inkubiert.

6.2 Immunfärbung

Die Färbelösung setzt sich aus 80 µl BCIP (50 mg ml^{-1} in 70 % Dimethylsulfoxid) und 60 µl NBT (20 mg ml^{-1} in 100 % Dimethylsulfoxid) in 10 ml Substratpuffer (100 mM Tris HCl (pH 9,5) mit 100 mM NaCl und 5 mM $MgCl_2$ * 6 H_2O) zusammen.
Nach der Herstellung der frischen Färbelösung wurde die Membran für maximal 30 min bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit demineralisiertem Wasser gestoppt.

7. Synthese von Coenzym A-aktivierten Hydroxyzimtsäuren

Für die Synthese von Feruloyl-CoA, Sinapoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA wurden zunächst 25,2 mg $NaHCO_3$ eingewogen und in 6 ml Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einen Glasrundkolben überführt und zur Entfernung von Luftsauerstoff für 15 min mit gasförmigem Stickstoff durchspült. Danach wurde der $NaHCO_3$ Lösung 1 ml entnommen und zu 23 mg Coenzym A (CoA, freie Säure) hinzugegeben. Nachdem sich das Coenzym A gelöst hatte, wurde dieses tropfenweise wieder zur Hauptlösung hinzupipettiert; die Lösung wurde weiterhin mit N_2 durchgast. 56 mg des Feruloyl-, Sinapoyl- oder 4-Cumaroyl-Succinimidesters wurden in Aceton gelöst und ebenfalls tropfenweise zur $NaHCO_3$ + CoA Lösung hinzugeben.

Es bildete sich ein Niederschlag, welcher sich durch die weitere Zugabe von Aceton löste. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend verschlossen und über Nacht an einem dunklen Ort stehen gelassen.
Am nächsten Tag wurde das Aceton in der Vakuumzentrifuge entfernt. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in neue Gefäße überführt und auf 4 % Ammoniumacetat eingestellt.
Für die Aufreinigung der Coenzym A Ester wurde die Festphasenextraktion verwendet. Die Chromabond C18ec Säulen wurden zuerst mit 30 ml Methanol und anschließend mit 30 ml Wasser vorbehandelt. Anschließend wurden die Säulen mit 30 ml einer 4 % Ammoniumacetat (w/v) Lösung konditioniert. Nach Auftragen der Coenzym A Ester Lösung auf die Säule, wurde sie 12 x mit 2 ml 4 % Ammoniumacetat gewaschen. Die Elution erfolgte fraktionsweise mit 12 x 2 ml Wasser. Anschließend wurde von jeder Fraktion ein Spektrum von 200 nm bis 500 nm aufgenommen. Die Fraktionen, die bei der jeweils in Tabelle 1 angegebenen Wellenlänge ihr Maximum besaßen, wurden im Anschluss gefriergetrocknet.

Tabelle 1 Zusammenstellung der Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Hydroxycinnamoyl-CoA Ester (Stöckigt und Zenk 1975; Zenk 1979)

CoA Ester	**Absorptionsmaximum bei λ [nm]**	**Extinktionskoeffizient ε x 10^6 [cm^2 mol^{-1}]**
Feruloyl-CoA	346	19
Sinapoyl-CoA	349	18
4-Cumaroyl-CoA	333	21

7.1 Berechnung und Einstellung der Konzentration

Nach der Gefriertrocknung wurden die Fraktionen in 50 µl demineralisiertem Wasser gelöst. Die Proben wurden verdünnt und anschließend photometrisch bei ihren Absorptionsmaxima (Tabelle 1) in Quarzküvetten vermessen.

Die Konzentration des Substrats errechnet sich nach der folgenden Formel [1] mit den spezifischen Extinktionskoeffizienten aus Tabelle 1.

$$c = \frac{\text{Absorption} * \text{Verdünnungsfaktor (Vf)}}{\text{spezifischer Extinktionskoeffizient } (\varepsilon)} = \frac{\text{mmol}}{\text{Rücklösevolumen } (\mu\text{l})} \qquad [1]$$

Es wurden jeweils Konzentrationen von 10 mM eingestellt und die synthetisierten Substrate entsprechend aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

8. Expression rekombinanter Proteine

8.1 *E. coli* SoluBL21

Die bakterielle Expression heterologer Gene erfolgte mit transformierten *E. coli* SoluBL21 Zellen. Zunächst wurden Übernachtkulturen (4 ml LB Medium mit 20 µl einer 20 mg ml^{-1} Ampicillin Stammlösung) der gewünschten Dauerkultur angelegt. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Übernachtkultur in 100 ml TB Medium (mit 500 µl einer 20 mg ml^{-1} Ampicillin Stammlösung) überführt. Die frisch angeimpfte Zellsuspension wurde im Schüttler bei 37 °C und 220 UpM kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD_{600} photometrisch bestimmt. Bei einer OD_{600} von 0,6 wurde die Kultur durch die Zugabe von 100 µl IPTG (1 M Stammlösung) zur Expression angeregt und über Nacht bei 25 °C und 180 UpM inkubiert.

8.1.1 Zellernte

Zur Abtrennung der Zellen vom Medium wurde die Bakterienkultur bei 4 °C und 3000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Nassgewicht der Zellen notiert. Anschließend wurden die geernteten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung, jedoch für mindestens eine Stunde, bei -80 °C zwischengelagert.

8.1.2 Zellaufschluss und Isolierung des gewünschten Zielproteins

Die zuvor geernteten Zellen wurden in 4 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) pro Gramm Bakteriengewicht resuspendiert. Anschließend wurde dem Ansatz eine Spatelspitze Lysozym (ca. 1 mg ml^{-1}) zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Ultraschallhomogenisator im Pulsiermodus (30 s mit 100 % Amplitude, 30 s pausieren; 4 Durchgänge) aufgeschlossen. Um einer zu starken Wärmeentwicklung entgegen zu wirken, wurden Zellen und Puffer während des Zellaufschlusses mit Eis gekühlt. Anschließend wurde das Homogenat bei 4 °C und 10000 x g für 10 min zentrifugiert. Der gewonnene zellfreie Rohextrakt wurde aliquotiert (für enzymatische Aktivitätstests, SDS-PAGE sowie Western Blot) und bis zur His-Tag-Aufreinigung über die Nickel-NTA-Säulen (Material und Methoden, Kapitel 9.1) bei -80 °C eingefroren.

8.2 SuperMan5-20 GlycoSwitch® *Pichia* (*Komagataella phaffii*)

Nach der Transformation des Hefestamms SuperMan5-20 GlycoSwitch® *Pichia* mit dem Zielgen (Material und Methoden, Kapitel 22.5) wurden pro 25 ml BMGY Medium (mit 50 µg ml^{-1} Zeocin) ein Klon von der Festmediumplatte gepickt und bei 230 UpM und 30 °C für mindestens 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension im Ausschwingrotor bei 500 x g und 4 °C abzentrifugiert und in 5 ml BMMY Medium resuspendiert. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde auf 5 x 1 Liter Erlenmeyerkolben mit je 200 ml BMMY Medium (50 µg ml^{-1} Zeocin) verteilt. Die Zellen wurden über Nacht bei 230 UpM und 30 °C im

Brutschrank geschüttelt. Am nächsten und den darauffolgenden Tagen wurden in jeden Kolben zusätzliche 1,5 % Methanol (v/v) zugegeben. Die Expression wurde für 5 Tage angesetzt.

8.2.1 Ernte von Zellen und Medium

Die Kulturen wurden im Ausschwingrotor bei 3900 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (Medium) wurde gesammelt und die Zellen gesondert mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zwischengelagert. Für die weitere Analyse des Expressionsmediums wurde das gesamte Volumen (1 Liter) mittels Nickel-NTA-Chromatographie (Material und Methoden, Kapitel 9.2) aufgereinigt.

8.2.2 Zellaufschluss der *Pichia*-Zellen

Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 2 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 pro Gramm Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 1,5 ml der Suspension mit 2,5 g mit Säure gewaschenen Glasperlen (~0.5 mm ø) vermischt. Der Aufschluss der Zellen wurde im Minilys Benchtop homogenizer bei 4000 UpM für 30 s mit drei Wiederholungen durchgeführt. Zwischen den einzelnen Aufschlusszyklen erfolgte eine Pause auf Eis von 30 s. Nach dem Aufschluss wurden die Minilys Aufschlussgefäße bis zum Absetzen der Glasperlen auf Eis zwischengelagert. Nachdem vorsichtig der Überstand der Suspension abpipettiert wurde, wurde diese 13000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Analytik (SDS-PAGE und Western Blot) bei -80 °C gelagert.

8.3 *Physcomitrium patens*

8.3.1 Vorkultur

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden stabile Transformanten ausgewählt (Material und Methoden, Kapitel 23.5). Zu Beginn wurde jeweils ein Transformant in 50 ml BCD Medium überführt und mittels Dispergierstab für mindestens 2 Minuten auf höchster Stufe zerkleinert. Anschließend wurden die Kulturen bei 110 UpM auf einem Rundschüttler für 14 Tage bei 24 °C wachsen gelassen. Nachdem sich die Pflanzenzellen deutlich vermehrt hatten, wurden diese in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem Dispergierstab erneut zerkleinert.

8.3.2 Hauptkultur

Für die Haupt-Expressionskultur wurde die zerkleinerte Zellsuspension gleichmäßig auf zwei 1 Liter Kolben mit 200 ml BCD Medium verteilt. Die Kulturen wurden bei 110 UpM auf einem

Rundschüttler für 14 Tage im Dauerlicht bei 24 °C geschüttelt. Eine Induktion der Expression ist bei *P. patens* nicht notwendig.

8.3.3 Zellernte und Gewinnung des Rohextrakts

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 14 Tagen wurde das Zellmaterial mit Hilfe einer Saugflasche abfiltriert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die Gewinnung des Rohextraktes wurde das Zellmaterial in einen Mörser überführt und mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinert. Danach wurde die Probe in ein ausreichend großes Gefäß eingewogen und mit 4 ml Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 pro Gramm Pulver versetzt. Der Reaktionsansatz wurde gut durchmischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 10000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das gewünschte Zielprotein wurde im Anschluss mittels Nickel-NTA Chromatographie aufgereinigt (Material und Methoden, Kapitel 9.1)

9. Reinigung mit His-tag versehener Proteine über eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni-NTA)

9.1 Aufreinigung über Tropfsäulen

<u>Vorbereitung der Chromatographie Säulen</u>

Für die Aufreinigung wurde die Ni-NTA-Suspension aufgeschüttelt und 1 ml in eine leere Säule gegeben. Nach dem Auslassen der Flüssigkeit wurde das Säulenmaterial dreimal mit Wasser gespült.

<u>Aufreinigung His-Tag-gekoppelter Proteine</u>

Zunächst wurden die Säulen mit 1 ml His-Tag Bindepuffer äqulibriert. Danach wurde der Proteinrohextrakt mit Imidazol und NaCl auf dieselbe Konzentration des Ni-NTA Bindepuffers eingestellt und auf die verschlossene Säule aufgetragen. Die auslaufsicher verschlossenen Säulen wurden in eine Schicht Eis eingegraben und für 60 min auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Säule geöffnet und die Durchflussfraktion (Fraktion D) aufgefangen. Anschließend wurde die Säule dreimal mit je 2 ml Waschpuffer gewaschen. Die Waschfraktionen (W 1-3) wurden ebenfalls für spätere Analysen aufgefangen. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch die Zugabe von dreimal je 1 ml Elutionspuffer. Die Elutionsfraktionen (E 1-3) wurden nach der Abnahme von jeweils 100 µl vereinigt und entsalzt (siehe Material und Methoden, Kapitel 9.3).

9.2 Aufreinigung über das automatisierte ÄKTA™ System

Das ÄKTA™ pure System von GE Healthcare ist ein automatisiertes Flüssigchromatographie-System zur Proteinisolierung und -aufreinigung. Mit Hilfe dieser Anlage und speziellen Affinitätssäulen können unter anderem große Volumina an Expressionskulturen ohne größeren Aufwand aufgereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System ausschließlich für die Aufreinigung His-Tag-gekoppelter Proteine aus der Glycoswitch Hefeexpression (Material und Methoden, Kapitel 8.2) verwendet.

Vorbereitung des Hefe-Kulturmediums

Vor dem Auftragen des Mediums (Material und Methoden, Kapitel 8.3.3) über das Pumpensystem der ÄKTA™ pure auf die Säule ROTI®Garose-His/Ni HP Kartusche wurde es hierfür entsprechend aufbereitet. Nach dem Auftauen des Mediums wurde diesem 10 mM Imidazol und 300 mM NaCl zugefügt. Anschließend wurde das Medium bei 10000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

Aufreinigungsprotokoll

Die einzelnen Schritte der Metallchelatchromatographie fanden automatisiert nach dem folgenden Protokoll statt.

Schritt	Bedingungen	Puffer
Äquilibrierung	5 Säulenvolumen (25 ml) Flussrate: 5 ml min^{-1}	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0
Probenauftrag	210 Säulenvolumen (1 Liter) Flussrate: 5 ml min^{-1}	
Waschen	25 Säulenvolumen (125 ml) Flussrate: 5 ml min^{-1}	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0
Elution	6 Säulenvolumen (30 ml) Fraktionierung: 2 ml Flussrate: 5 ml min^{-1}	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8,0

Nach Ende des Programms wurde die Säule gereinigt und bei 4 °C gelagert.

Säulenreinigung	Flussrate: 5 ml min^{-1} Laufzeit: 10 min	A. dem.
	Flussrate: 5 ml min^{-1} Laufzeit: 30 min	0,5 M NaOH
	Flussrate: 5 ml min^{-1} Laufzeit: 10 min	A. dem.
Säulenlagerung	Flussrate: 5 ml min^{-1}	30 % (v/v) Ethanol

9.3 PD-10 Chromatographie zur Proteinentsalzung

Nach der Aufreinigung His-Tag-gekoppelter Proteine wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und über die PD-10 Säulen entsalzt. Nach dem Spülen der Säule mit 25 ml entionisiertem Wasser wurde die Säule mit Puffer äquilibriert. Die Wahl des Puffers war abhängig vom exprimierten Protein. Anschließend wurden 2,5 ml der vereinigten Elutionsfraktionen (Material und Methoden Kapitel 9.1) aufgebracht. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Elution erfolgte danach mit 3,5 ml des proteinspezifischen, optimalen Puffers.

10. Enzymcharakterisierung

10.1 Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)

In der vorliegenden Arbeit wurde die PAL-Aktivität sowohl photometrisch, als auch durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Ein direkter Vergleich beider Methoden resultierte in einer deutlich höheren spezifischen PAL-Aktivität bei photometrischen Bestimmungen. Aus diesem Grund wurden alle Analysen photometrisch durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten wurden mit der Formel [2] aus Material und Methoden Kapitel 11.1 berechnet. Für die Enzymtests wurden im Reaktionsansatz Proteingesamtmengen zwischen 1,3 µg und 12,6 µg verwendet.

10.1.1 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts

Zur Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts wurden die spezifischen Aktivitäten der PAL mit den folgenden Puffersystemen gemessen:

Puffersystem	pH-Bereich
0,5 M Tris HCl	pH 6,0 - 11,0
0,5 M Borsäure Borax*	pH 7,0 - 10,0
0,5 M CAPS†	pH 9,5 - 11,0
0,5 M CHES‡	pH 9,5 - 11,0

Für den Testansatz wurden 850 µl der jeweiligen Puffer mit 100 µl Substrat (0,1 M L-Phenylalanin gelöst in A. dem.) versetzt und im beheizten Photometer bei 38 °C für 3 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl rekombinant hergestelltem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Die lineare Zunahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von λ = 290 nm über einen Zeitraum von 5 Minuten photometrisch detektiert. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Referenzküvetten enthielten anstelle von 50 µl rekombinantem Enzym zusätzliche 50 µl Puffer.

10.1.2 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte über photometrische Endpunktmessung. Es wurden Inkubationstemperaturen zwischen 15 °C und 90 °C ausgewählt.

Hierfür wurden 850 µl Puffer (PAL 1: 0,5 M Tris (pH 9,0) und PAL 2: 0,5 M Tris (pH 8,5)) und 100 µl Substrat (0,1 M L-Phenylalanin gelöst im Puffer) in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und im beheizten Thermoblock für 5 min vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion im Thermoblock durch die Zugabe von 50 µl rekombinant hergestelltem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Die Reaktionszeit betrug 5 min. Die enzymatische Umsetzungsreaktion wurde mit 100 µl einer 6 M HCl Lösung abgestoppt. Danach wurde der Reaktionsansatz in Acrylküvetten überführt und photometrisch bei λ = 290 nm gemessen. Für jede ausgewählte Temperatur wurden drei Replikate und eine Referenz erstellt. In die Referenzgefäße wurden erst 100 µl einer 6 M HCl Lösung vorgelegt, bevor dem Gefäß 50 µl Enzym hinzugegeben wurde.

* Die Lösungen wurden bis zum gewünschten pH-Wert miteinander gemischt.

† Die jeweiligen pH-Werte wurden mit HCl eingestellt.

‡ Die jeweiligen pH-Werte wurden mit NaOH eingestellt.

10.1.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit L-Histidin

Hierfür wurden 540 µl Puffer (PAL 1: 0,5 M Tris (pH 9,0) und PAL 2: 0,5 M Tris (pH 8,5)), 200 µl 20 mM Glutathion (gelöst im Puffer) und 200 µl L-Histidin (20 mM Stammlösung in Puffer) in einer Quarzküvette vorgelegt und im Photometer für 2 min bei 38 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion im Photometer durch die Zugabe von 50 µl rekombinant hergestelltem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Die lineare Zunahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von λ = 277 nm für 15 min gemessen.

10.1.4 Enzymkinetik

10.1.4.1 L-Phenylalanin

Anhand des ermittelten optimalen Puffersystems wurde für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ein 0,5 M Tris HCl-Puffer (für PAL 1 mit pH 9,0 und für PAL 2 mit pH 8,5) verwendet. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden unterschiedliche L-Phenylalanin-Endkonzentrationen zwischen 4 µM und 5000 µM (gelöst in Puffer) verwendet. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes wurde auf 1 ml festgelegt. Puffer und Substrat wurden in einer Acrylküvette vorgelegt und im Photometer für 2 min bei 38 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch die Zugabe von 50 µl rekombinantem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Die lineare Zunahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von λ = 290 nm für 5 min gemessen.

10.1.4.2 D-Phenylalanin

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden unterschiedliche D-Phenylalanin-Konzentrationen zwischen 100 µM und 2000 µM (gelöst in Puffer) verwendet. Die Messung erfolgte wie unter Material und Methoden Punkt 10.1.4.1 beschrieben. Die lineare Zunahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von λ = 290 nm für 15 min gemessen.

10.1.4.3 L-Tyrosin

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden unterschiedliche L-Tyrosin-Konzentrationen zwischen 200 µM und 6000 µM (gelöst in 0,5 M HCl) verwendet. Die Messung erfolgte wie unter Material und Methoden Kapitel 10.1.4.1 beschrieben. Das zugegebene Substrat-Gesamtvolumen wurde aufgrund des Lösungsmittels (0,5 M HCl) auf maximal 40 µl festgesetzt. Um zu gewährleisten, dass in jedem Reaktionsansatz dieselbe Menge an Salzsäure vorliegt, wurden geringere Substratvolumina mit einer 0,5 M HCl Lösung auf das maximale Volumen aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl rekombinantem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Die lineare Zunahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von λ = 309 nm für 15 min gemessen.

10.2 Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD)

Für die nachfolgend beschriebenen Enzymtests wurden im Reaktionsansatz Proteingesamtmengen zwischen 3,6 µg und 8,1 µg verwendet.

10.2.1 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts

Zur Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers sowie pH-Werts wurden die spezifischen Aktivitäten der CAD in den folgenden Puffersystemen gemessen:

Puffersystem	pH-Bereich
0,5 M KH_2PO_4/K_2HPO_4[§]	pH 5,5 - 8,5
0,5 M Tris HCl	pH 6,0 - 9,0
0,5 M CAPS[**]	pH 9,5 - 11,0
0,5 M CHES[††]	pH 9,5 - 11,0

Für den Testansatz wurden jeweils 912,5 µl Puffer mit 12,5 µl Substrat (32 mM Coniferylalkohol in 20 % Ethanol) und 50 µl Cosubstrat (2 mM $NADP^+$) versetzt und im beheizten Photometer bei 30 °C für 3 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µl rekombinant hergestelltem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Die lineare Zunahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von λ = 400 nm über einen Zeitraum von 5 Minuten photometrisch gemessen. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Referenzgefäße enthielten anstelle von 25 µl rekombinantem Enzym zusätzliche 25 µl Puffer. Die spezifischen Aktivitäten wurden mit der Formel [2] aus dem Material und Methoden Kapitel 11.1 berechnet.

10.2.2 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurden Inkubationstemperaturen zwischen 15 °C und 90 °C ausgewählt.

Hierfür wurden 900 µl Puffer (0,1 M Tris HCl-Puffer pH 8,8) mit 25 µl Substrat (16 mM Coniferylalkohol in 20 % Ethanol) und 50 µl Cosubstrat (2 mM $NADP^+$) in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und im beheizten Thermoblock für 5 min vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 25 µl rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Die Reaktionszeit betrug 5 min und wurde mit 50 µl einer 6 M HCl Lösung abgestoppt. Danach wurde der Reaktionsansatz in Acrylküvetten überführt und photometrisch

[§] Die Lösungen wurden bis zum gewünschten pH-Wert miteinander gemischt.

[**] Die jeweiligen pH-Werte wurden mit HCl eingestellt.

[††] Die jeweiligen pH-Werte wurden mit NaOH eingestellt.

bei λ = 400 nm gemessen. Für jede ausgewählte Temperatur wurden drei Replikate und eine Referenz erstellt.

10.2.3 Enzymkinetik

10.2.3.1 Coniferylalkohol

Anhand des im Material und Methoden Kapitel 10.2.1 ermittelten optimalen Puffersystems wurde für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ein 0,1 M Tris HCl-Puffer pH 8,8 verwendet. Es wurden unterschiedliche Coniferylalkohol-Endkonzentrationen zwischen 25 µM und 1200 µM (gelöst in 20 % Ethanol) verwendet. Aufgrund der inhibierenden Wirkung von Ethanol auf das Enzym wurde ein maximales Substratvolumen von 25 µl ml^{-1} festgelegt. Um zu gewährleisten, dass in jedem Reaktionsansatz dasselbe Volumen an Ethanol vorliegt, wurden geringere Substratvolumina mit 20 % Ethanol auf das maximale Volumen aufgefüllt. Die Konzentration des Cosubstrates $NADP^+$ wurde auf 100 µM (gelöst in Puffer) festgelegt. Der enzymatische Aktivitätsnachweis erfolgte über einen Zeitraum von 10 min bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C. Der Ansatz wurde durch die Zugabe des Enzyms gestartet. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung.

10.2.3.2 $NADP^+$

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden unterschiedliche $NADP^+$-Endkonzentrationen zwischen 10 µM und 400 µM (gelöst in Puffer) verwendet. Die Konzentration des Substrats Coniferylalkohol im Ansatz wurde auf 400 µM festgelegt. Die Reaktionszeit betrug 10 min bei einer Temperatur von 30 °C.

10.3 Chalkonsynthase (CHS)

Die Bestimmung der Chalkonsynthase-Aktivität erfolgte nicht über die photometrischen Bestimmungsmethoden, sondern über die Bestimmung der gebildeten Produktmenge per HPLC (Material und Methoden, Kapitel 12). Für die Enzymtests wurden im Reaktionsansatz Proteingesamtmengen zwischen 0,8 µg und 2,8 µg verwendet.

10.3.1 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts

Zur Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers sowie pH-Werts wurden die spezifischen Aktivitäten der CHS in folgenden Puffersystemen gemessen:

Puffersystem	pH-Bereich
0,5 M KH_2PO_4/ K_2HPO_4[‡‡]	pH 6,0 - 8,5

[‡‡] Die Lösungen wurden bis zum gewünschten pH-Wert miteinander gemischt

0,5 M Tris HCl	pH 6,5 - 10,0

Für den Testansatz wurden jeweils 150 µl Puffer mit 10 µl 4-Cumaroyl-CoA (1,5 mM Stammlösung gelöst in A. dem.) und 15 µl Malonyl-CoA (2 mM Stammlösung gelöst in A. dem.) versetzt und im Thermoblock bei 30 °C für 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µl rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch das Aufheizen der Proben für 5 min auf 100 °C abgestoppt. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung. Nachdem die Proben kurz auf Eis zwischengelagert wurden, wurden diese zweimal mit 500 µl Ethylacetat extrahiert und jeweils für 5 min bei 13000 x g abzentrifugiert. Die obere Phase wurde in neue Gefäße pipettiert und das Ethylacetat mittels Vakuumzentrifugation entfernt.

Nach Rücklösen des Rückstands in 100 µl Laufmittel (50 % Methanol mit 0,01 % Phosphorsäure (85 %)) wurden die Proben über die HPLC vermessen. Es wurden zwei Wellenlängen von λ = 288 nm (für Naringenin) und λ = 370 nm (für Naringenin-Chalkon) vermessen.

<u>Messparameter</u>

Stationäre Phase:	Equisil ODS-Säule (4 mm ø, 250 mm Länge, 20 mm Vorsäule)
Flussrate:	1,0 ml min^{-1}
Probenvolumen:	20 µl
Laufmittel:	50 % Methanol mit 0,01 % Phosphorsäure
Laufdauer pro Probe:	15 min
Retentionszeit der Produkte:	Naringenin: ca. 7,8 min
	Naringenin-Chalkon: ca. 10,3 min

10.3.2 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurden Inkubationstemperaturen zwischen 10 °C und 80 °C ausgewählt. Für den Testansatz wurde ein 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 7,7 verwendet. Die Messung erfolgte wie bereits unter Material und Methoden Punkt 10.3.1 beschrieben.

10.3.3 Bestimmung der CHS Aktivität mit Caffeoyl-CoA als Substrat

Für den Testansatz wurden jeweils 140 µl 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 7,7 mit 20 µl Caffeoyl-CoA (0,74 mM Stammlösung gelöst in A. dem.) und 15 µl Malonyl-CoA (2 mM Stammlösung gelöst in A. dem.) versetzt und im Thermoblock bei 30 °C für 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µl rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem Enzym gestartet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch das Aufheizen der Proben für 5 min auf 100 °C abgestoppt. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung.

Nachdem die Proben kurz auf Eis zwischengelagert wurden, wurden diese zweimal mit 500 µl Ethylacetat extrahiert und jeweils für 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in neue Gefäße pipettiert und das Ethylacetat mittels Vakuumzentrifugation entfernt.

Nach Rücklösen des Rückstands in 100 µl Laufmittel (35 % Methanol mit 0,01 % Phosphorsäure (85 %)) wurden die Proben über die HPLC bei einer Wellenlänge von λ = 288 nm (für Eriodictyol) vermessen.

Messparameter

Stationäre Phase:	Equisil ODS-Säule (4 mm ø, 250 mm Länge, 20 mm Vorsäule)
Flussrate:	1,0 ml min^{-1}
Probenvolumen:	20 µl
Laufmittel:	35 % Methanol mit 0,01 % Phosphorsäure
Laufdauer pro Probe:	30 min

Retentionszeit des Produktes: Eriodictyol ca. 22 min

10.3.4 Enzymkinetik

10.3.4.1 4-Cumaroyl-CoA

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wurde ein 0,5 M Tris HCl-Puffer pH 7,7 verwendet. Es wurden unterschiedliche 4-Cumaroyl-CoA-Konzentrationen zwischen 5 µM und 75 µM (gelöst in demineralisiertem Wasser) verwendet. Die Konzentration von Malonyl-CoA im Ansatz wurde auf 150 µM festgelegt. Die Reaktionstemperatur betrug 30 °C und die Reaktionszeit 3 min. Die Messung erfolgte wie bereits unter Material und Methoden Punkt 10.3.1 beschrieben.

10.3.4.2 Malonyl-CoA

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde ein 0,5 M Tris HCl-Puffer pH 7,7 verwendet. Es wurden unterschiedliche Malonyl-Coenzym A-Konzentrationen zwischen 5 µM und 150 µM (gelöst in demineralisiertem Wasser) verwendet. Die Konzentration des 4-Cumaroyl-CoA wurde auf 75 µM festgelegt. Die Messung erfolgte wie bereits unter Material und Methoden Punkt 10.3.1 beschrieben.

10.4 Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR)

In der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen Parameter der CCR (Material und Methoden, Kapitel 10.4.5.2) sowohl photometrisch, als auch durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Ein direkter Vergleich beider Methoden resultierte zwar in einer höheren spezifischen Aktivität aus HPLC-Bestimmungen, jedoch in einer schlechteren Trennleistung bei Substratkonzentrationen größer als 200 µM. Diese konnten leider auch nicht durch eine Anpassung des Protokolls und des Laufmittels behoben werden, woraufhin die weiteren Analysen photometrisch durchgeführt wurden. Für die Enzymtests wurden im Reaktionsansatz Proteingesamtmengen zwischen 0,3 µg und 9,5 µg verwendet.

10.4.1 Photometrische Bestimmungsmethode

Die CCR-Aktivität wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von λ = 366 nm in Acrylküvetten bestimmt. Aufgrund der starken Spektren-Überlagerung der einzelnen Komponenten im Reaktionsansatz (siehe Anhang II, Kapitel 3), wurde die Berechnung der spezifischen Aktivität nach der Methode von Lüderitz und Grisebach (1981) durchgeführt.

10.4.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Werts

Zur Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers sowie pH-Werts wurden die folgenden Puffersysteme verwendet:

Puffersystem	pH-Bereich
0,5 M KH_2PO_4/ K_2HPO_4[§§]	pH 5,5 - 8,5
0,04 M Britton Robinson[***]	pH 6,0 - 9,0

Für den Testansatz wurden jeweils 950 µl Puffer mit 20 µl rekombinant exprimierten und aufgereinigtem Enzym und 20 µl Cosubstrat (5 mM $NADPH_2$ gelöst in A. dem.) versetzt und im beheizten Photometer bei 30 °C für 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl 4-Cumaroyl-CoA (10 mM Stammlösung) gestartet. Die lineare Abnahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei λ = 366 nm über einen Zeitraum von 15 Minuten photometrisch detektiert. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Referenzgefäße enthielten anstelle von 20 µl rekombinantem Enzym zusätzliche 20 µl Puffer.

[§§] Die Lösungen wurden bis zum gewünschten pH-Wert miteinander gemischt.

[***] Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt.

10.4.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte über die photometrische Echtzeitmessung mit Temperierung durch ein Peltierelement (siehe Material und Methoden Kapitel 11). Da die Berechnung der spezifischen Aktivität nach der Methode von Lüderitz und Grisebach (1981) erfolgte, wurden für die nachfolgenden enzymatischen Charakterisierungen ein 100 mM Natrium-Kaliumphosphat-Puffer (100 mM Na_2HPO_4 und 100 mM KH_2PO_4 Lösung gemischt zum gewünschten pH-Wert von 6,25) äquivalent zur Publikation gewählt.

Für den Testansatz wurden jeweils 950 µl Puffer mit 5 µl 4-Cumaroyl-CoA (5 mM Stammlösung gelöst in A. dem.) und 20 µl Cosubstrat (5 mM $NADPH_2$ gelöst in A. dem.) versetzt und bei den jeweiligen Temperaturen bis zum Erreichen der Messtemperatur vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Es wurden Inkubationstemperaturen zwischen 10 °C und 55 °C gewählt.

Die lineare Abnahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei λ = 366 nm über einen Zeitraum von 2 Minuten photometrisch detektiert. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Referenzgefäße enthielten anstelle von 20 µl rekombinantem Enzym zusätzliche 20 µl Puffer.

10.4.4 Vergleich unterschiedlicher Hydroxycinnamoyl-CoA Thioester

Für den Testansatz wurden jeweils 950 µl Puffer mit 4-Cumaroyl-CoA oder Caffeoyl-CoA (50 µM im Ansatz) versetzt mit 20 µl Cosubstrat (5 mM $NADPH_2$ gelöst in A. dem.) versetzt und bei 30 °C für 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem Enzym gestartet. Die lineare Abnahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei λ = 366 nm über einen Zeitraum von 15 Minuten photometrisch detektiert. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Referenzgefäße enthielten anstelle von 20 µl rekombinantem Enzym zusätzliche 20 µl Puffer.

10.4.5 Enzymkinetik

10.4.5.1 Feruloyl-CoA mit $NADPH_2$ als Cosubstrat

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden unterschiedliche Feruloyl-CoA-Konzentrationen zwischen 5 µM und 40 µM verwendet. Die Konzentration des Cosubstrates $NADPH_2$ im Ansatz wurde auf 100 µM festgelegt. Die Reaktionstemperatur betrug 30 °C und das Gesamtvolumen 1 ml. Die lineare Abnahme der Extinktion wurde kontinuierlich bei λ = 366 nm in Acrylküvetten über einen Zeitraum von 10 Minuten photometrisch detektiert. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Referenzgefäße enthielten anstelle des Enzyms die äquivalente Menge an Puffer.

10.4.5.2 Feruloyl-CoA mit $NADH_2$ als Cosubstrat

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden unterschiedliche Feruloyl-CoA-Konzentrationen zwischen 2,5 µM und 150 µM verwendet. Die Konzentration des Cosubstrates $NADH_2$ im Ansatz wurde auf 100 µM festgelegt.

10.4.5.3 Variation von $NADPH_2$ mit Feruloyl-CoA

Für die Messungen wurden unterschiedliche $NADPH_2$-Konzentrationen zwischen 5 µM und 150 µM verwendet. Die Konzentration an Feruloyl-CoA im Ansatz wurde auf 25 µM festgelegt. Die Messungen erfolgten wie bereits unter Material und Methoden Punkt 10.4.5.1 und beschrieben.

10.4.5.4 Variation von $NADH_2$ mit Feruloyl-CoA

Für die Messungen wurden unterschiedliche $NADH_2$-Konzentrationen zwischen 5 µM und 150 µM verwendet. Die Konzentration an Feruloyl-CoA im Ansatz wurde auf 50 µM festgelegt. Die Messungen erfolgten wie bereits unter Material und Methoden Punkt 10.4.5.1 beschrieben.

10.4.5.5 Sinapoyl-CoA mit $NADPH_2$ als Cosubstrat

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden unterschiedliche Sinapoyl-CoA-Konzentrationen zwischen 2,5 µM und 65 µM verwendet. Die Konzentration des Cosubstrates $NADPH_2$ im Ansatz wurde auf 100 µM festgelegt. Die Messungen erfolgten wie bereits unter Material und Methoden Punkt 10.4.5.1 beschrieben.

10.5 Peroxidase

Für den Nachweis der Peroxidaseaktivität wurden 15 µl rekombinant hergestelltes Protein mit 400 µl Substratlösung (0,4 mM ABTS in 0,1 M KH_2PO_4 pH 5,0 mit 0,01 % H_2O_2) versetzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Enzyms gestartet. Die Inkubationszeit betrug maximal 15 min. Die enzymatische Umsetzung konnte als dunkelgrüne Färbung direkt optisch wahrgenommen werden. Als Positivkontrolle wurde die Reaktion mit einer kommerziellen Peroxidase isoliert aus Meerrettich durchgeführt.

C. Analytische Methoden

11. Photometrische Bestimmungsmethoden

Für die photometrische Aktivitätsbestimmung wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

Echtzeitmessung

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter, sowie des pH- und Pufferoptimums wurde eine automatisierte und kontinuierliche Messung über einen festgelegten Zeitraum durchgeführt.

Endpunktmessung

Mit Ausnahme des Enzyms CCR (siehe Material und Methoden Kapitel 10.4.3), erfolgte die Bestimmung des Temperaturoptimums über die photometrische Endpunktmessung. Bei dieser Methode wurde die enzymatische Reaktion in einem temperierbaren Thermoblock durchgeführt und nach Ablauf der Reaktionszeit durch die Zugabe von Säure zunächst abgestoppt. Anschließend wurden die Proben gegen eine Referenz photometrisch bei einer festgelegten Wellenlänge gemessen. In das Referenzgefäß wurde zuerst die Salzsäure hinzugegeben und anschließend das Enzym.

11.1 Berechnung der spezifischen Enzymaktivität

Für die Berechnung der enzymatischen Aktivität wurde als Ausgangswert die lineare Steigung der Extinktionszu- oder abnahme pro Sekunde eingesetzt. Die spezifische Aktivität (in µkat kg^{-1}) wurde mit der nachfolgenden Formel [2] berechnet:

$$\text{spezifische Aktivität}\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}*\text{kg}}\right) = \frac{\Delta\text{E}*(\mu\text{mol})*\text{V}(\text{cm}^3)}{(\text{s})*\text{Proteinmenge (kg)}*\text{d}(\text{cm})*\varepsilon\,(\text{cm}^2)} \qquad [2]$$

ΔE	Steigung der Extinktionszu- oder abnahme pro Reaktionszeit (s^{-1})
V	Gesamtvolumen des Testansatzes (1 ml = 1 cm^3)
d	Schichtdicke der Küvette (cm)
cProt	Proteinmenge im Testansatz (kg)
ε	Extinktionskoeffizient (cm^2 μmol^{-1})

t-Zimtsäure: 10 cm^2 μmol^{-1} bei λ = 290 nm

4-Cumarsäure: 12 cm^2 μmol^{-1} bei λ = 309 nm

Coniferaldehyd: 21 cm^2 μmol^{-1} bei λ = 400 nm

Urocaninsäure: 10 cm^2 μmol^{-1} bei λ = 277 nm

11.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm. Hierfür wurde die Probe mit RNAse freiem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt und photometrisch gemessen.

Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$$c = OD_{260} * V * F \qquad [3]$$

V = Verdünnungsfaktor
Der Multiplikationsfaktor (F) für RNA beträgt 40.
Der Multiplikationsfaktor (F) für DNA beträgt 50.

Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Quotient aus den gemessenen Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt [4]. Er sollte bei 1,8 bis 2,0 liegen.

$$\text{Reinheit DNA/RNA} = \frac{\mathrm{E260}}{\mathrm{E280}} \qquad [4]$$

12. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Flüssigkeitschromatographie (LC) bildet eine der wichtigsten analytischen Trennmethoden. Die HPLC arbeitet mit speziellen Säulen, die unter Hochdruck (MPa Bereich) kleinste Substanzmengen innerhalb weniger Minuten mit einer sehr hohen Leistung voneinander trennen können.

Bei der HPLC befindet sich das Probengemisch zwischen zwei Phasen, der mobilen und der stationären Phase. Die stationäre Phase beschreibt die Säule, die mit kleinen Teilchen fester, poröser und oberflächenaktiver Materialien gepackt ist. Die mobile Phase dagegen ist eine Flüssigkeit, das sogenannte Laufmittel. Die mobile Phase wird mit Hilfe der Pumpen durch die Säule befördert. Die chromatographische Trennung beruht auf dem Prinzip der Verteilung. Substanzkomponenten die ein intensiveres Bindungsvermögen zu den Oberflächengruppen der stationären Phase besitzen, eluieren langsamer als jene, deren Bindung stärker zur mobilen Phase ist. Die Auftrennungen werden in einem Chromatogramm dargestellt. In der Regel wird die Intensität der UV-Absorption gegen die Zeit aufgetragen. Wird eine Kalibriergerade mit bekannten Produktkonzentrationen über die HPLC aufgetrennt, so ist diese proportional zur Peakfläche (Gey 2008).

Durchführung

Nach Abstoppen der jeweiligen Enzymreaktion wurden die Proben zweimal mit 500 µl Ethylacetat extrahiert und jeweils für 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Gefäße pipettiert und das Ethylacetat mittels Vakuumzentrifugation verdampft. Danach wurden die Proben in 100 µl Laufmittel rückgelöst und in spezielle Probengefäße überführt. Anschließend wurden die Proben über die HPLC vermessen.

Messparameter

Stationäre Phase:	Equisil ODS-Säule (4 mm ø, 250 mm Länge, 20 mm Vorsäule)
Flussrate:	1,0 ml min^{-1}
Probenvolumen:	20 µl
Laufmittel:	variabel
Laufzeit pro Probe:	variabel

12.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Chalkonsynthase (CHS) mittels HPLC

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Chalkonsynthase wurde zunächst eine Kalibriergerade der erwarteten Reaktionsprodukte mit der HPLC erstellt (siehe Anhang II, Kapitel 2). Durch die Reaktion der Chalkonsynthase entsteht zunächst das instabile Produkt Naringenin-Chalkon. Dieses reagiert entweder spontan oder enzymatisch durch die Chalkonisomerase zu Naringenin. Beide Chemikalien wurden zur Bestimmung der Elutionszeiten in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 5 µM über HPLC vermessen. Das Naringenin wird bei einer Wellenlänge von λ = 288 nm, das Naringenin-Chalkon bei einer Wellenlänge von λ = 370 nm detektiert. Durch die Auftragung der entstandenen Peakflächen im Verhältnis zu den Konzentrationen des jeweiligen Produktes wurde eine Kalibriergerade erstellt. Durch eine lineare Regression und eine Bestimmung der Steigung der Geraden wurde anschließend die Stoffmenge an Naringenin im Reaktionsansatz rechnerisch ermittelt.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität anhand der Produktkonzentration errechnet sich aus der Formel [5]:

$$\text{spezifische Aktivität}\left(\frac{\text{nmol}}{\text{kg}*\text{s}}\right) = \frac{\text{Stoffmenge (nmol)}}{\text{Proteinmenge (kg)} * \text{Reaktionszeit (s)}} \qquad [5]$$

D. Molekularbiologische Methoden

13. RNA-Extraktion

Die Extraktion von RNA erfolgte im Wesentlichen nach Chomczynski und Sacchi (1987). Das Ausgangsmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Dann wurden 100 mg feines Pulver in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit 500 µl Lösung D bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend wurden zunächst 50 µl einer 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4) und 500 µl Phenol (Citratpuffer-gesättigt) hinzugegeben und der Ansatz vorsichtig geschwenkt. Danach wurde dem Ansatz 100 µl eisgekühltes Chloroform zugegeben und die Reaktionsgefäße für 10 s kräftig gemischt. Nach Inkubation der Proben für 15 Minuten auf Eis wurde die Mischung bei 12000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 400 µl des wässrigen Überstandes in ein neues Gefäß überführt und mit 400 µl eiskaltem Isopropanol versetzt. Die Proben wurden für die RNA-Fällung bei -20 °C für 15 min inkubiert und erneut bei 10000 x g für 10 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zuerst mit 70 % Ethanol und anschließend mit 96 % Ethanol gewaschen. Die Proben wurden zwischen den Waschschritten jeweils bei 7500 x g für 5 min und 4 °C zentrifugiert und die Überstände jeweils verworfen. Das Pellet wurde bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem Wasser gelöst.

14. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde der qScript cDNA Super Mix verwendet.
Der Ansatz für die cDNA-Synthese setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Volumen
qScript Supermix (5x)	4,0 µl
RNA	5,0 µl
RNAse-freies Wasser	11,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Die Proben wurden bei 25 °C für 5 min, bei 42 °C für 30 min und bei 85 °C für 5 min inkubiert. Nach Ablauf der Synthese wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

15. DNA-Isolierung

Die Zusammensetzungen der in diesem Kapitel verwendeten Puffer sind im Anhang I, Kapitel 24.7 verzeichnet (Rogers und Bendich 1985).
Das Ausgangsmaterial wurde zunächst mit flüssigem Stickstoff versetzt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Anschließend wurden 200 mg Pulver in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit 300 µl auf 65 °C vorgewärmtem 2x CTAB-Puffer versetzt. Danach wurden

die Proben für 30 min bei 65 °C inkubiert und zwischenzeitig kräftig gemischt. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis (15 min) wurden dem Reaktionsansatz 300 µl Chloroform zugegeben und wiederum gemischt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 30 µl 10x CTAB-Puffer und 300 µl Chloroform wurde der Ansatz erneut gemischt und unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µl des wässrigen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl CTAB-Präzipitationspuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das dünne Sediment wurde anschließend in 200 µl High Salt TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 400 µl Ethanol (p.a. 99 %) zu den Proben wurden diese für 15 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 15 min bei 13000 x g zentrifugiert und das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde dieses mit 50 µl TE Puffer und 0,5 µl RNAse A (Stammlösung 100 µg ml^{-1}) gelöst und für 15 min bei 37 °C inkubiert.

16. Polymerasekettenreaktion

16.1 Klassische PCR

16.1.1 GoTaq Polymerase

Für die Standard PCR wurde die GoTaq DNA-Polymerase verwendet. Diese Polymerase besitzt keine Korrekturlese- und keine Heißstart-Funktion, jedoch eine höhere und robustere Amplifikationsausbeute.

Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen
DNA oder cDNA	1,0 µl
5x GoTaq Puffer	5,0 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	3,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Vorwärtsprimer (10 nmol $µl^{-1}$)	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 nmol $µl^{-1}$)	0,5 µl
GoTaq Polymerase (5 u $µl^{-1}$)	0,1 µl
RNAse-freies Wasser	14,4 µl
Gesamtvolumen	**25,0 µl**

Die PCR verlief nach dem folgenden Protokoll:

Initiale Denaturierung:	95 °C für 3 min	
Denaturierung:	95 °C für 30 s	
Annealing:	Tm – 5 °C für 30 s	40 Zyklen
Elongation:	72 °C für 2 min	
Finale Elongation:	72 °C für 10 min	

16.2 PCR mit korrekturaktiven Polymerasen

16.2.1 Accuprime® DNA Polymerase

Für diese PCR wurde die Accuprime® Polymerase verwendet. Diese Polymerase zeichnet sich durch ihre hohe Genauigkeit und integrierte Heißstart-Modifikation aus. Im Vergleich zur Taq-Polymerase arbeitet die Accuprime um das Neunfache zuverlässiger.

Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen
DNA oder cDNA	1,0 µl
10x Accuprime Puffer Nr. 1	2,5 µl
Vorwärtsprimer (10 nmol μl^{-1})	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 nmol μl^{-1})	0,5 µl
Accuprime Polymerase (5 u μl^{-1})	0,1 µl
RNAse-freies Wasser	20,4 µl
Gesamtvolumen	**25,0 µl**

Die PCR verlief nach dem folgenden Protokoll:

Initiale Denaturierung:	94 °C für 90 s	
Denaturierung:	94°C für 30 s	
Annealing:	Tm – 5 °C für 30 s	40 Zyklen
Elongation:	68 °C für 3 min	
Finale Elongation:	68 °C für 3 min	

16.2.2 KOD® DNA-Polymerase

Für die PCR wurde die KOD® Polymerase verwendet. Diese Polymerase zeichnet sich durch ihre hohe Genauigkeit und eine doppelte Geschwindigkeit im Vergleich zur Taq-Polymerase aus. Darüber hinaus besitzt die Polymerase eine 3‘→5‘ Exonuclease-abhängige Korrekturlesefunktion.

Die PCR Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Komponente	**Volumen**
DNA oder cDNA	1,00 µl
10x KOD Puffer	2,50 µl
$MgSO_4$ (25 mM)	1,50 µl
dNTPs (10 mM)	2,50 µl
Vorwärtsprimer (10 nmol $µl^{-1}$)	0,75 µl
Rückwärtsprimer (10 nmol $µl^{-1}$)	0,75 µl
KOD Polymerase (2,5 u $µl^{-1}$)	0,50 µl
RNAse-freies Wasser	15,50 µl
Gesamtvolumen	**25,00 µl**

Die PCR verlief nach dem folgenden Protokoll:

Initiale Denaturierung:	95 °C für 2 min	
Denaturierung:	95 °C für 20 s	
Annealing:	Tm – 5 °C für 10 s	40 Zyklen
Elongation:	72 °C für 1 min	
∞	10 °C	

16.3 RACE Polymerasekettenreaktion

Die 5‘- und 3‘-rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR wurde mit dem SMARTer® RACE 5‘/3‘-Kit durchgeführt. Die Herstellung der benötigten Ausgangsmaterialien (modifizierte cDNA) lehnten sich an die Angaben des Herstellers an.

<u>cDNA Synthese</u>

Für die Synthese der 5´- und 3´-RACE cDNA wurden folgende Ansätze pipettiert und im Anschluss für 3 min bei 72 °C, gefolgt von 2 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert.

5´-RACE	**3´-RACE**
5,0 µl RNA	5,0 µl RNA
1,0 µl 5´-CDS Primer A	1,0 µl 3´-CDS Primer A
5,0 µl H_2O	5,0 µl H_2O

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Ansätze kurz in der Tischzentrifuge bei 13000 x g für 10 s zentrifugiert. Anschließend wurden den Reaktionsansätzen die folgenden Komponenten zugefügt:

Komponente	**Volumen**
SMARTer II A Oligonukleotide (nur bei 5‘-RACE cDNA Synthese)	1,0 µl
5x First Strand Puffer	4,0 µl
DTT (100 mM)	0,5 µl
dNTPs (20 mM)	1,0 µl
RNAse Inhibitor (40 U ml^{-1})	0,5 µl
Reverse Transkriptase	2,0 µl
Gesamtvolumen	**9,0 µl**

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend zuerst für 90 min bei 42 °C und danach für 10 min bei 70 °C inkubiert.

Die PCR Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Komponente	**Volumen**
cDNA (5´- oder 3´-modifiziert)	1,5 µl
2x SeqAmp Puffer	12,5 µl
10x Universal Primer Mix (UPM)	2,5 µl
SeqAmp Polymerase	0,5 µl
5´ oder 3´ genspezifische Primer (nmol $µl^{-1}$)	1,0 µl
RNAse-freies Wasser	7,0 µl
Gesamtvolumen	**25,0 µl**

Die PCR verlief nach dem folgenden Protokoll:

Initiale Denaturierung:	95 °C für 3 min	
Denaturierung:	95 °C für 30 s	
Annealing:	Tm – 5 °C für 30 s	40 Zyklen
Elongation:	72 °C für 2 min	
Finale Elongation:	72 °C für 10 min	

16.4 In-Fusion Polymerasekettenreaktion

Für die In-Fusion PCR werden spezielle Primer benötigt. Diese enthalten neben einer überlappenden Sequenz des gewünschten Zielvektors eine passende Restriktionsschnittstelle und die ersten bzw. letzten 15 Basenpaare des gewünschten Zielproteins. Für die erfolgreiche Durchführung der PCR wurde die Proofreading KOD® Hot Start Polymerase verwendet.

Die PCR Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Komponente	**Volumen**
cDNA	1,00 µl
10x Puffer	5,00 µl
$MgSO_4$ (25 mM)	3,00 µl
Vorwärtsprimer (10 nmol $µl^{-1}$)	0,75 µl
Rückwärtsprimer (10 nmol $µl^{-1}$)	0,75 µl
KOD Hot Start Polymerase	0,50 µl
dNTPs (10 mM)	0,50 µl
RNAse-freies Wasser	15,50 µl
Gesamtvolumen	**25,00 µl**

Die PCR verlief nach dem folgenden Protokoll:

Initiale Denaturierung:	95 °C für 2 min	
Denaturierung:	95 °C für 20 s	
Annealing:	Tm – 5 °C für 10 s	40 Zyklen
Elongation:	72 °C für 1,5 min	
Finale Elongation:	72 °C für 5 min	

16.5 Fusions-Polymerasekettenreaktion

Die Fusions-PCR wird für die *in-vitro* Entfernung von Intronsequenzen aus genomischen DNA-Abschnitten oder deren Amplifikaten eingesetzt. Für jeden codierenden Exon-Abschnitt werden zwei Primer benötigt. Der äußere Primer enthält eine Restriktionsschnittstelle, passend zum gewählten Expressionsvektor. Der innere Primer besteht jeweils zur Hälfte aus den codierenden Exon-Bereichen, die nachfolgend miteinander verknüpft werden sollen (Abb. 12). Die Länge des Primers sollte mindestens 30 Basenpaare, jedoch nicht mehr als 45 Basenpaare sein.

Im ersten Schritt werden zunächst alle codierenden Exon-Teilabschnitte amplifiziert. Im zweiten Schritt der Fusions-PCR dienen die amplifizierten Teilsequenzen als Ausgangsmaterial für die Synthese der Volllänge. Am Ende entsteht eine Volllängensequenz ohne nicht-codierende(n) Intronbereich(e).

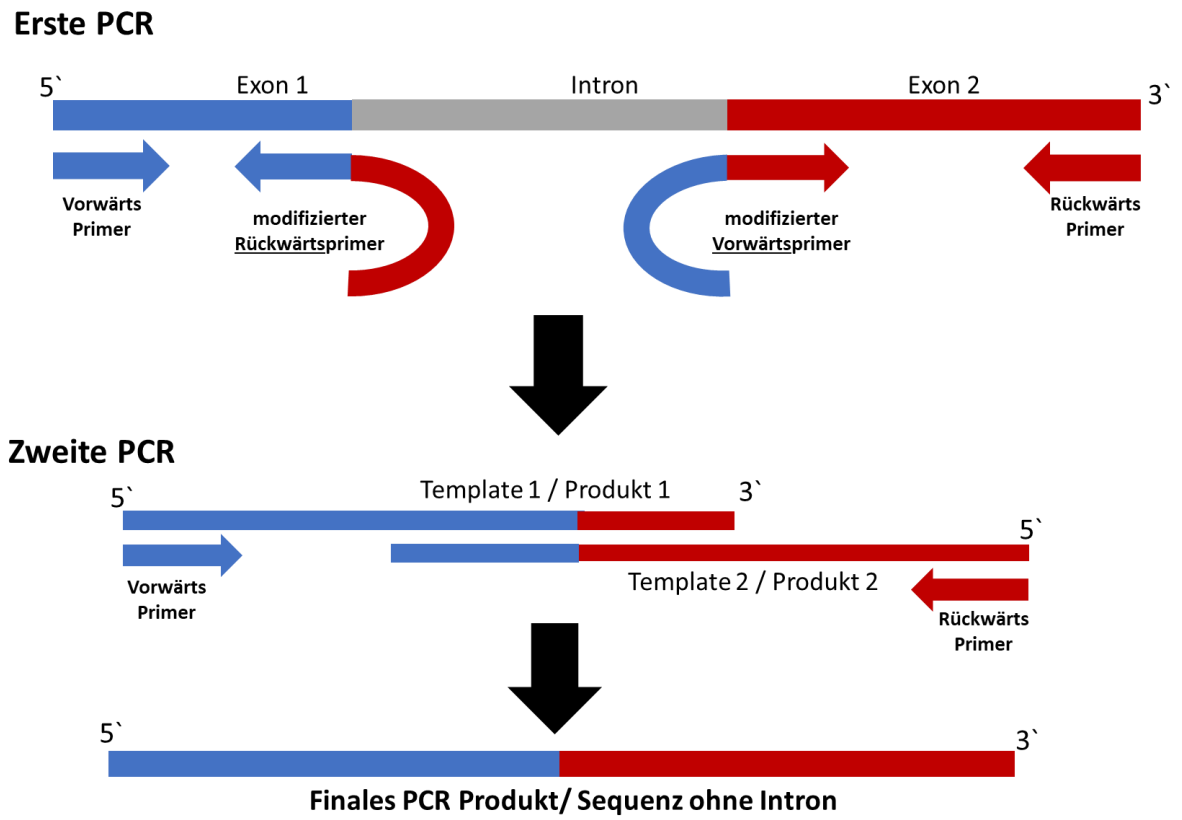


Abb. 12 Graphische Darstellung der Fusions-Polymerasekettenreaktion. Sie setzt sich aus zwei nacheinander ablaufenden PCR-Reaktionen zusammen.

Der PCR-Ansatz für den ersten Schritt setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	**Volumen**
gDNA	1,0 µl
10x Puffer	5,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Vorwärtsprimer (10 nmol μl^{-1})	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 nmol μl^{-1})	0,5 µl
Phusion Polymerase	1,0 µl
RNAse-freies Wasser	15,0 µl
Gesamtvolumen	**25,0 µl**

Die PCR verlief nach dem folgenden Protokoll:

Initiale Denaturierung:	95 °C für 3 min	
Denaturierung:	95 °C für 30 s	
Annealing:	Tm – 5 °C für 30 s	40 Zyklen
Elongation:	72 °C für 2 min	
Finale Elongation:	72 °C für 5 min	

Der PCR-Ansatz für den zweiten Schritt setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	**Volumen**
PCR Produkte aus Schritt 1	je 1,0 µl
10x Puffer	5,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Vorwärtsprimer (10 nmol μl^{-1})	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 nmol μl^{-1})	0,5 µl
Phusion Polymerase	1,0 µl
RNAse-freies Wasser	15,0 µl
Gesamtvolumen	**25,0 µl**

Das PCR-Protokoll entspricht dem der ersten Reaktion.

16.6 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Die Kolonie-PCR wird für den Nachweis der Fremd-DNA in transformierten Hefekolonien eingesetzt. Hierfür werden direkt Hefekolonien als DNA-Vorlage verwendet.

Ein Klon der transformierten Hefezellen wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers gepickt und in 100 µl 200 mM Lithiumchlorid mit 1 % SDS suspendiert und für 5 min bei 70 °C inkubiert. In diesem Schritt wurden die Zellen zur Freisetzung der DNA lysiert. Für die DNA-Fällung wurden 300 µl Ethanol (96 %) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Die Proben wurden für 3 min bei 13000 x g zentrifugiert und das Pellet in 50 µl Wasser rückgelöst. 2 µl der Lösung wurden für eine Standard-PCR mit der GoTaq Polymerase verwendet. Als Positivkontrolle diente der Vektor mit dem eingefügten Zielgen.

Komponente	**Volumen**
Lysat der Hefezellen	1,0 µl
5x GoTaq Puffer	5,0 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	3,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Vorwärtsprimer (10 nmol μl^{-1})	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 nmol μl^{-1})	0,5 µl
GoTaq Polymerase (5 u μl^{-1})	0,1 µl
RNAse-freies Wasser	14,4 µl
Gesamtvolumen	**25,0 µl**

Die PCR verlief nach dem folgenden Protokoll:

Initiale Denaturierung:	95 °C für 2 min	
Denaturierung:	95 °C für 30 s	
Annealing:	55 °C für 30 s	40 Zyklen
Elongation:	72 °C für 90 s	
Finale Elongation:	72 °C für 10 min	

17. Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, mit deren Hilfe DNA- oder RNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt werden können. Das Gel besteht aus dem Polysaccharid Agarose, welches aus Meeresalgen gewonnen wird. Agarose selbst ist ein Pulver, das sich nur in heißem Wasser bzw. Puffer (TAE; Tris/Essigsäure/EDTA) bis zu einer Konzentration von 5 % (w/v) löst und im abgekühlten Zustand ein Gel bildet. Die Gelbildung entsteht durch die Quervernetzung der

Agarosemoleküle untereinander über Wasserstoffbrückenbindungen. Die Konzentration der Agarose im Puffer richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Teilchen. Hierbei gilt: Kleinere Partikel lassen sich besser in einem höherprozentigen Gel trennen, größere Partikel dagegen in einem niedrigprozentigen Gel.

Zur Auftrennung von DNA- oder RNA-Stücken wurde ein 0,7-1 % Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose eingewogen und in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris mit 20 mM Eisessig und 1 mM $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$) aufgekocht. Anschließend wurde die Agarose in den fertig zusammengebauten Gelschlitten gegossen und mit 2 Tropfen Ethidiumbromidlösung (0,025 % i. d. Tropfflasche) pro 50 ml flüssige Agarose versetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Agarosegels wurde der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt und die Kammer mit TAE-Puffer befüllt. Zu den 25 µl des PCR Ansatzes wurden 6 µl Loading Dye (Anhang I, Kapitel 24.6) zugegeben. Nach dem Einpipettieren des Größenmarkers und der PCR-Proben in die entsprechenden Geltaschen wurde die Auftrennung der Proben gestartet. Der Spannung betrug 130 Volt und die Laufzeit 30 min.

17.1 Gelextraktion und Aufreinigung

Nach der Agarosegelelektrophorese wurde das Gel in der Dokumentationskammer betrachtet. Nach der Aufnahme eines Bildes wurden die gewünschten DNA-Banden mit Hilfe einer Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Extraktion der gewünschten DNA-Bande erfolgte nach der Anleitung des NucleoSpin® Extract II Kits.

18. Ligation

18.1 pDRIVE Vektor

Für die Ligation in den pDRIVE Vektor wurde das Qiagen PCR cloning Kit verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Volumen
Ligation Master Mix	2,5 µl
pDrive Klonierungsvektor	0,5 µl
Isoliertes PCR Produkt	2,0 µl
Gesamtvolumen	**5,0 µl**

Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurden die Proben bei 65 °C für 15 min inkubiert.

18.2 pET15b Vektor

Für die Ligation in den pET15b Vektor wurde das T4 DNA-Ligase Kit verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Volumen
T4 DNA Ligase 10x Puffer	1,0 µl
Klonierungsvektor (50 ng)	1,0 µl
Insert (37,5 ng)	0,5 µl
T4 DNA Ligase (400 u μl^{-1})	0,5 µl
Wasser	7,0 µl
Gesamtvolumen	**10,0 µl**

Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurden die Proben bei 65 °C für 10 min inkubiert.

18.3 pRSET C Vektor

Für die Ligation in den pRSET C Vektor wurde das T4 DNA-Ligase Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Material und Methoden Kapitel 18.2 beschrieben.

18.4 pPICZα-A Vektor

Für die Ligation in den pPICZα-A Vektor wurde das T4 DNA-Ligase Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Material und Methoden Kapitel 18.2 beschrieben.

18.5 In-Fusion Klonierung

Für die In-Fusion Klonierung wurde das HD Cloning Kit verwendet. Der Klonierungsansatz setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Volumen
5x In-Fusion Premix	2,0 µl
Klonierungsvektor (50-100 ng)	2,0 µl
Insert In-Fusion PCR Produkt (50-100 ng)	1,0 µl
Wasser	5,0 µl
Gesamtvolumen	**10,0 µl**

Anschließend wurde der Klonierungsansatz für 15 min bei 50 °C im Thermoblock inkubiert. Der Reaktionsansatz war direkt für die Transformation fertig.

19. *Escherichia coli* Bakterienstämme

19.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Als Kompetenz beschreibt man die Eigenschaft bzw. Fähigkeit von Zellen, in Lösung befindliche freie DNA aufnehmen können. Nur bestimmte Bakterienarten verfügen über eine natürliche Kompetenz, die jedoch streng reguliert ist. Das Darmbakterium *E. coli* besitzt keine natürliche Kompetenz. Diese kann unter anderem durch eine Behandlung mit Calciumchlorid erreicht werden.

Zu Beginn wurden 4 ml LB Medium mit 4 µl Tetrazyklin (12,5 mg μl^{-1}) in ein steriles Reagenzglas pipettiert. Anschließend wurden ca. 5 µl *E. coli* EZ Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur zugegeben und das mit einem Deckel verschlossene Gefäß über Nacht bei 37 °C bei 220 UpM in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 2 ml der Kultur zu 100 ml LB Medium mit 100 µl Tetracyklin (12,5 mg μl^{-1}) pipettiert und bei 37 °C in dem Schüttelinkubator bei 220 UpM inkubiert. Sobald die optische Dichte (OD_{600}) bei λ = 600 nm zwischen 0,4 und 0,6 lag, wurde die Kultur bei 3500 x g für 10 min und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml 100 mM $CaCl_2$ (steril) resuspendiert und erneut bei 3500 x g für 10 min und 4 °C abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet erneut in 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und für 20 min auf Eis stehen gelassen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen bei 2500 x g für 10 min und 4 °C wurde das Pellet in 3,6 ml steriler $CaCl_2$-Lösung (100 mM mit 15 % Glycerin) resuspendiert und in Portionen von 180 µl in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach dem Einfrieren der Gefäße in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

Die Herstellung kompetenter *E. coli* SoluBL21 erfolgte hier analog zum beschriebenen Protokoll. Es wurde dem Medium jedoch kein Tetrazyklin zugegeben.

19.2 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden 70 µl kompetente Zellsuspension auf Eis aufgetaut und zum Ligationsansatz zugegeben. Die Bakterienzellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s bei 42 °C in einem Thermoblock inkubiert. Danach wurden dem Ansatz 150 µl vorgewärmtes SOC-Medium (37 °C) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C in einem Thermoblock inkubiert und auf die ebenfalls bei 37 °C vorgewärmten LB-Festmediumplatten mit 10 mg ml^{-1} Ampicillin, 50 µM IPTG und 8 mg ml^{-1} X-Gal (Anhang I, 24.1) ausplattiert. Die Agarplatten wurden mit Nesco-Film verschlossen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Transformation von *E. coli* SoluBL21 Zellen erfolgte hier analog zum beschriebenen Protokoll.

19.3 Vervielfältigung ausgewählter Kolonien

Zunächst wurden jeweils 20 µl Ampicillin (20 mg ml^{-1} in A. dem.) in ein steriles Reagenzglas pipettiert und mit 4 ml LB-Medium versetzt. Anschließend wurden jeweils einzeln gewachsene Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte ausgewählt und in das Reagenzglas gegeben. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C mit 220 UpM in einem Schüttelinkubator inkubiert.

19.4 Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen

Zum Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen der Bakterien wurden 425 µl Bakterienkultur in einem sterilen Reaktionsgefäß mit 75 µl sterilem Glycerol vermischt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Glycerin-Dauerkulturen bei -80°C gelagert.

20. Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung aus der Übernacht-Kultur wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Es wurden nacheinander 2 x 1,5 ml Bakterienkultur in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 5000 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet nach den Protokollangaben des Herstellers weiterverarbeitet:

Das Zellpellet wurde mit 250 µl P1 Puffer resuspendiert. Anschließend wurde dem Ansatz 250 µl P2 Puffer zugegeben und die Proben 4-6-mal umgeschwenkt. Danach wurden 350 µl N3 Puffer zupipettiert und die Proben erneut 4-6-mal umgeschwenkt. Die Bakterienlysate wurden bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand in die QIAprep Säulen überführt. Die Gefäße wurden für 60 s bei 13000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen mit 500 µl PB-Puffer gewaschen. Nach der erneuten Zentrifugation der Säulen unter denselben Bedingungen wurden diese mit 750 µl PE Puffer gewaschen. Die Säulen wurden zweimal unter den bereits genannten Bedingungen zentrifugiert bis das Säulenmaterial vollständig trocken war. Für die Elution der DNA wurden jeweils 50 µl Reinstwasser auf jede QIAprep Säule pipettiert und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Säulen bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die aufgereinigten Plasmide.

21. Restriktionsverdau

21.1 pDRIVE® Vektor

Der Restriktionsverdau des pDRIVE® Vektors wurde mit dem Enzym EcoRI durchgeführt.

Komponente	Volumen
EcoRI Puffer (10x)	1,5 µl
EcoRI	0,5 µl
Plasmid	3,0 µl
dem. H_2O	10,0 µl
Gesamtvolumen	**15,0 µl**

Der Verdau wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert.

21.2 pET15b Vektor

Für den Restriktionsverdau des pET15b Vektors können die Restriktionsenzyme NdeI, BamHI und XhoI verwendet werden. Der Verdau wurde nach Zugabe aller Komponenten und Mischen für 3 h bei 37 °C inkubiert.

Komponente	Menge
Cut Smart Puffer (10x)	1,5 µl
Restriktionsenzym I	0,5 µl
Restriktionsenzym II	0,5 µl
Plasmid	3,0 µl
dem. H_2O	9,5 µl
Gesamtvolumen	**15,0 µl**

21.3 pRSET C Vektor

Für den Restriktionsverdau des pRSET C Vektors wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI verwendet. Die Durchführung erfolgte wie unter Material und Methoden Kapitel 21.2 beschrieben.

21.4 pPICZα-A Vektor

Der Vektor wurde mit EcoRI und NotI geschnitten. Die Durchführung erfolgte wie unter Material und Methoden Kapitel 21.2 beschrieben. Die Restriktionsenzyme wurden am Folgetag bei 65 °C für 20 min hitzeinaktiviert.

22. Glycoswitch® Superman5 Hefesystem

22.1 Vermehrung des pPICZα-A Vektors

Die Vervielfältigung des hefespezifischen Expressionsvektors pPICZα-A mit der inserierten codierenden Sequenz des Zielgens wurde in *E. coli* EZ Zellen durchgeführt. Zum Animpfen wurden bereits vorhandene Glycerin-Dauerkulturen von L. Poppe (2017) verwendet. Für die Zellvermehrung wurde ein LB-Lennox Medium (siehe Anhang I, Kapitel 24.1) mit geringerem Salzgehalt eingesetzt, da das Antibiotikum Zeocin gegenüber hohen Natriumchlorid-Konzentrationen empfindlich reagiert und seine Wirkungsweise verliert. Anschließend wurde der Vektor wie in Material und Methoden Kapitel 20 beschrieben isoliert.

22.2 Linearisierung des Vektors mit integriertem Zielgen

Für die Transformation der Hefezellen musste der Vektor in linearisierter Form vorliegen. Je nach integriertem Zielgen im Vektor wurden unterschiedliche Restriktionsenzyme eingesetzt. Für die Laccase und die dirigierenden Proteine wurde das Restriktionsenzym SacI verwendet, für die Peroxidase das Restriktionsenzym BstXI.

Komponente	**Volumen**
Spezifischer Puffer (10x)	2,0 µl
SacI oder BstXI	5,0 µl
Plasmid	10,0 µl
dem. H_2O	3,0 µl
Gesamtvolumen	**20,0 µl**

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht entweder im Brutschrank oder im Thermoblock inkubiert (SacI bei 37 °C, BstXI bei 55 °C). Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei SacI bei 65 °C und bei BstXI bei 80 °C für 20 Minuten.

22.3 Aufreinigung des linearisierten Vektors

Die Aufreinigung des linearisierten Vektors erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Material und Methoden Kapitel 17) sowie einer anschließenden Säulenextraktion (siehe Material und Methoden Kapitel 17.1).

22.4 Vermehrung von *Pichia pastoris* Superman5 Hefezellen

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde von einer YPD Festmediumplatte oder einer Glycerin-Dauerkultur ein Abstrich erstellt und in 5 ml YPD Medium überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml einer 100 mM

Lithiumchlorid-Lösung gewaschen. Der Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 400 µl einer 100 mM Lithiumchlorid-Lösung resuspendiert. Für die Transformation wurden jeweils 50 µl der Zellsuspension in 1,5 ml Gefäße aliquotiert und bis zum Start der Transformation (Material und Methoden Kapitel 22.5) auf Eis zwischengelagert.

22.5 Lithiumchlorid-Transformation in *Pichia pastoris* Superman5 Hefezellen

Allgemein eignet sich für die Transformation von Hefezellen entweder die Lithiumchlorid- (Gietz & Schiestl, 1996) oder die Lithiumacetat-Methode. Da in dieser Arbeit mit einem modifiziertem *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) Hefestamm gearbeitet wurde, wurde die empfohlene Lithiumchlorid-Methode angewendet.

Herstellung der Träger DNA

Die Träger-DNA (Fischsperma-DNA) wurde zuerst in TE-Puffer pH 8,0 für 2 Stunden unter ständigem Rühren gelöst und anschließend für 5 min auf 99 °C erhitzt. Danach wurde die Träger-DNA aliquotiert und entweder bei -80 °C eingefroren oder kurzfristig auf Eis gelagert.

Transformation

Zunächst wurde der 50 µl Ansatz an Hefezellen (aus Material und Methoden Kapitel 22.4) erneut bei 4000 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Für jeden Transformationsansatz wurden die folgenden Komponenten in festgelegter Reihenfolge zugegeben:

50 % PEG	240 µl
1 M Lithiumchlorid	36 µl
2 mg ml^{-1} Träger-DNA	25 µl
Plasmid DNA (5–10 µg)	50 µl

Anschließend wurden die Ansätze so lange geschüttelt bis das Zellpellet vollständig suspendiert war. Danach wurde der Ansatz bei 30 °C für 30 min inkubiert. Die Transformationsansätze wurden für den Hitzeschock für 25 min bei 42 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 8000 x g wurde das Pellet in 1 ml YPD Medium für 3 Stunden bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl der Lösung auf YPD Festmediumplatten (mit 50 ng $µl^{-1}$ Zeocin) aufgetragen und bei 30 °C für 3-4 Tage im Brutschrank inkubiert.

23. *Physcomitrium patens*

23.1 Zielgen und Vektorvorbereitung

Die Amplifikation und Ligation in die entsprechenden Vektoren erfolgte durch Julia Wohl (2020 – Anleitung siehe Kapitel 2.11 in ihrer Arbeit)

23.2 Herstellung von Protoplasten

Vorbereitung

Zunächst wurde der *Physcomitrium patens* Wildtyp als Suspensionskultur in 50 ml BCD-Medium bei 220 UpM auf einem Rundschüttler für 8 Tage wachsen gelassen. Anschließend wurden die Pflanzenzellen in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem Dispergierstab für mindestens 2 Minuten auf höchster Stufe zerkleinert. Danach wurde die Suspension gleichmäßig auf acht BCDA Platten, auf die zuvor eine sterile Zellophan (Cellulosehydrat)-Membran aufgelegt worden war, verteilt. Das Pflanzenmaterial wurde im Anschluss für 6 Tage unter dauerhafter Lichteinstrahlung wachsen gelassen.

23.3 Isolierung von Protoplasten

Im ersten Schritt wurde der *P. patens* Wildtyp von allen acht BCDA Platten unter sterilen Bedingungen abgeerntet und mit 15 ml Mannitol (8,5 %) und 5 ml frisch hergestellter Driselase-Lösung (2 % in 8,5 % Mannitol) in eine neue Petrischale überführt. Anschließend wurde die Platte für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde in regelmäßigen zeitlichen Abständen leicht geschwenkt. Nachdem sich im Zentrum der Petrischale die Protoplasten angesammelt hatten, wurde die Suspension durch einen sterilen Filter mit einer Porengröße von 100 µm filtriert und für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Suspension durch einen sterilen Filter mit einer Porengröße von 50 µm filtriert. Der Durchfluss enthielt größtenteils die isolierten Protoplasten.

Anschließend wurden die isolierten Protoplasten für 5 min bei 100 x g bei Raumtemperatur in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Das Sediment wurde zum Waschen in 10 ml Mannitol (8,5 % mit 10 mM $CaCl_2$) resuspendiert und erneut für 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml Mannitol (8,5 % mit 10 mM $CaCl_2$) resuspendiert, um die Protoplastenzahl auszuzählen.

23.3.1 Bestimmung der Protoplastenzahl

20 µl der Protoplastensuspension wurden in die Fuchs-Rosenthal Kammer pipettiert. Anschließend wurden 6 große Felder mit je 16 kleinen Feldern (siehe Abb. 13) ausgezählt.

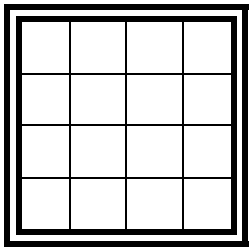


Abb. 13 Darstellung eines großen Feldes mit 16 kleinen Feldern der Fuchs-Rosenthal Kammer. Die Großfelder sind voneinander durch Doppellinien am Rand getrennt.

Der Mittelwert aus 6 Großfeldern entspricht dem Wert X für die folgende Berechnungsformel [6]

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{X}}{0{,}2\ \mu\text{l}} = \frac{\text{N}}{\mu\text{l}} * 1000 = \frac{\text{N}}{\text{ml}} * 5\ \text{ml} \qquad [6]$$

Eine einzelne Protoplastentransformation benötigt zwischen 350000 und 500000 Protoplasten. Nach Abzentrifugieren der Protoplasten wurden die Protoplasten in MMM Puffer (Anhang I, Kapitel 24.4) so resuspendiert, dass sich in 300 µl Puffer 500000 Protoplasten befinden.

23.4 Transformation

Für die Transformation wurden 15 µg linearisierter Vektor mit dem Zielgen (gelöst in 30 µl TE Puffer pH 7,5) in sterile 15 ml Reaktionsgefäße pipettiert und 300 µl Protoplastensuspension zugegeben. Danach wurden in alle Reaktionsgefäße 300 µl PEG-Transformationslösung pipettiert und die Suspension vorsichtig durch leichtes Schwenken vermischt. Anschließend wurden die Transformationsansätze für 5 min bei 45 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde die toxische PEG-Transformationslösung über mehrere Schritte verdünnt. Zu Beginn wurde in einminütigen Intervallen 5 x 300 µl Mannitol (8,5 % mit 10 mM $CaCl_2$) zugegeben und anschließend in weiteren einminütigen Intervallen 5 x 1 ml Mannitol (8,5 % mit 10 mM $CaCl_2$). Nach Inkubation der Protoplastensuspension für 30 min bei Raumtemperatur wurden die Ansätze für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Protoplasten wurden mit 2 ml Mannitol (8,5 % mit 10 mM $CaCl_2$) resuspendiert. Nach Zugabe von 3 ml auf 45 °C vorgewärmtem PRMT-Medium (Anhang I, Kapitel 24.4) zu jedem Transformationsansatz wurden jeweils 1,25 ml der

Suspension auf eine PRMB Agarplatte (mit aufgelegter steriler Zellophanfolie) ausplattiert. Pro Transformation wurden zwei Agarplatten angelegt.
Die Platten wurden für 30 min offen in steriler laminarer Luftströmung stehen gelassen und dann mit ihrem Deckel und Mikropore-Band verschlossen. Die Platten wurden für eine Woche bis zur ersten Selektion im „Tageslicht“-Kulturraum unter Zusatzbeleuchtung durch Leuchtstoffröhren platziert.

23.5 Regeneration und Selektion

In den darauffolgenden Wochen regenerierten die transformierten Protoplasten und wurden mehrfach auf verschiedenen Medien selektiert.
In der ersten Woche konnten sich die Protoplasten regenerieren. Bei einer visuellen Überprüfung konnten pro Platte 2 bis 15 Zellklone nachgewiesen werden. In der zweiten Woche erfolgte eine erste Selektion der Protoplasten. Hierfür wurde die Zellophanfolie, auf welcher die Zellklone gewachsen waren, auf neue BCDA Platten (mit 25 mg l^{-1} Hygromycin B) überführt. Nicht transformierte Protoplasten starben aufgrund der fehlenden Hygromycinresistenz.

In den darauffolgenden 14 Tagen wurde die Zellophanfolie zweimal auf neue, antibiotikafreie BCDA Platten überführt.

In der 5. Woche wurde die Cellulosemembran erneut auf BCDA Platten mit 25 mg l^{-1} Hygromycin B platziert. Dies hatte zur Folge, dass bis zu 90 % der Zellen/Protonemata starben und nur stabile Transformanten, bei denen die Fremd-DNA stabil ins Genom integriert war, übrigblieben. Ausreichend groß gewachsene Transformanten wurden anschließend auf BCD Festmediumplatten überführt.

24. Anhang I

24.1 Zellkulturmedien

B5-Medium (Gamborg et al. 1968)

Das B5-Medium wird als Standardmedium für die Kallus- und Suspensionszellkulturen von *Silybum marianum* verwendet.

Makroelemente		Mikroelemente	
KNO_3	2500,0 mg l^{-1}	H_3BO_3	3,00 mg l^{-1}
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	250,0 mg l^{-1}	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	3,00 mg l^{-1}
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	150,0 mg l^{-1}	$MnSO_4 \cdot H_2O$	1,00 mg l^{-1}
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	150,0 mg l^{-1}	KJ	0,75 mg l^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	134,0 mg l^{-1}	$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,25 mg l^{-1}
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	25,6 mg l^{-1}	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,25 mg l^{-1}
Na_2 EDTA	34,3 mg l^{-1}	$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,25 mg l^{-1}

CB-Vitamine		Hormone	
Thiaminhydrochlorid	10 mg l^{-1}	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	1,0 mg l^{-1}
Pyridoxin HCl	1 mg l^{-1}	Kinetin	0,1 mg l^{-1}
Nicotinsäure	1 mg l^{-1}		

weitere Komponenten	
myo-Inositol	100 mg l^{-1}
Saccharose	20 g l^{-1}
± Agar-Agar	10 g l^{-1}

Der pH-Wert von 5,8 wurde mit 0,5 M Kaliumhydroxidlösung eingestellt.

Lysogeny Broth (LB)

Das LB Medium ist das Standardmedium für die Kultivierung von *Escherichia coli* Bakterien (Sezonov et al. 2007).

Trypton	10 g l^{-1}
Hefeextrakt	5 g l^{-1}
NaCl	10 g l^{-1}
± Agar-Agar	10 g l^{-1}

Der pH-Wert von 7,0 wurde mit 0,5 M Natriumhydroxidlösung eingestellt.

LB-Festmediumplatten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal

Es wurden 100 ml festes LB-Medium in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurden dem abgekühlten Medium 50 µl IPTG (0,1 M Stammlösung in A. dem.), 160 µl X-Gal (50 mg ml^{-1} in DMSO) und 500 µl Ampicillin (20 mg ml^{-1} A. dem.) zugegeben. Danach wurden jeweils ca. 10 ml des fertigen LB-Mediums in Petrischalen pipettiert. Um eine optimale Verteilung und Aushärtung des Mediums zu gewährleisten, wurden die Petrischalen kurz auf der Tischplatte in kreisenden Bewegungen horizontal geschwenkt.

Lysogeny Broth Lennox (LB-low)

Die Niedrigsalz-Formulierung des LB Lennox Mediums wird bei der Verwendung von empfindlichen Antibiotika (Zeocin) eingesetzt.

Trypton	10 g l^{-1}
Hefeextrakt	5 g l^{-1}
NaCl	5 g l^{-1}
± Agar-Agar	10 g l^{-1}

Terrific broth (TB) Medium

Das TB-Medium (Tartoff and Hobbs 1987) ist ein reichhaltiges Medium für die Vermehrung und Anzucht von *E. coli*. Das Medium erlaubt eine höhere Zelldichte und eignet sich besonders für die rekombinante Expression von Zielproteinen.

Trypton	12 g l^{-1}
Hefeextrakt	24 g l^{-1}
Glycerol	4 g l^{-1}
Phosphatpuffer	100 ml l^{-1}

Nach dem Autoklavieren werden vor dem Gebrauch des Mediums 10 ml des folgenden Phosphat-Puffers hinzugegeben.

Phosphat Puffer

KH_2PO_4	0,17 M
K_2HPO_4	0,72 M

Es erfolgt keine pH-Wert Einstellung.

Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)

Das SOC-Medium (Hanahan 1983) ist ein Komplexmedium für die Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmiden.

Trypton/ Pepton	20,0 g l^{-1}
Hefeextrakt	5,0 g l^{-1}
NaCl	0,5 g l^{-1}
Magnesiumchlorid	10,0 mM
Kaliumchlorid	2,5 mM
Magnesiumsulfat	10,0 mM

Nach dem Autoklavieren werden vor dem Gebrauch des Mediums noch 20 mM Glucose (2 M Stammlösung) hinzugegeben. Die Glucose-Stammlösung wurde mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) Medium

Das YPD ist ein vollwertiges Medium für die Anzucht von Hefezellen in flüssiger oder fester Kultur.

Trypton/Pepton	20 g l^{-1}
Hefeextrakt	5 g l^{-1}
Glucose	20 g l^{-1}
± Agar-Agar	10 g l^{-1}

Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY)

Das BMGY Medium wird für die Vorkultivierung und Erhöhung der Zelldichte von bereits transformierten Hefezellen verwendet.

Hefeextrakt	10,0 g l^{-1}
Trypton/Pepton	20,0 g l^{-1}
Yeast nitrogen base	13,4 g l^{-1}
D-(+)-Biotin	4,0 mg l^{-1}
Glycerol	10,0 g l^{-1}
1 M KH_2PO_4 pH 6,0	100,0 ml l^{-1}

Buffered Methanol-complex Medium (BMMY)

Das BMMY Medium wird für die Expression von Zielproteinen in rekombinanten Hefezellen eingesetzt.

Hefeextrakt	10,0 g l^{-1}
Trypton/Pepton	20,0 g l^{-1}
Yeast nitrogen base	13,4 g l^{-1}
D-(+)-Biotin	4,0 mg l^{-1}
1 M KH_2PO_4 pH 6,0	100,0 ml l^{-1}

Nach dem Autoklavieren des Mediums wurde diesem 5 g l^{-1} sterilfiltriertes Methanol zugegeben.

BCD Medium

Das BCD Medium (Cove et al. 2009) wurde für die Kultivierung von *Physcomitrium patens* als Standardmedium eingesetzt. Das Medium setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen, die zunächst in Form von Stammlösungen angesetzt wurden.

Stammlösungen		
Lösung B	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	25 g l^{-1}
Lösung C*	KH_2PO_4 pH 6,5	25 g l^{-1}
Lösung D	KNO_3	101 g l^{-1}

***** Die Einstellung des pH-Werts erfolgte mit 4 M KOH.

TES Hoagland´s A-Z

H_3BO_3	614 mg l^{-1}
$Al_2(SO_4)$ $K_2SO_4 \cdot 24\ H_2O$	55 mg l^{-1}
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	55 mg l^{-1}
KBr	28 mg l^{-1}
LiCl	28 mg l^{-1}
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	389 mg l^{-1}
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	55 mg l^{-1}
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	55 mg l^{-1}
KI	28 mg l^{-1}
$SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$	28 mg l^{-1}

BCD Medium

Lösung B	10,0 ml l^{-1}
Lösung C	10,0 ml l^{-1}
Lösung D	10,0 ml l^{-1}
TES Hoagland	1,0 ml l^{-1}
$CaCl_2$	219,0 mg l^{-1}
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	12,5 mg l^{-1}
± Agar-Agar	7,0 g l^{-1}

Für die Herstellung von Protoplasten wurde dem BCD-Medium zusätzlich 920 mg l^{-1} L-(+)-Diammoniumtartrat (= BCDA) hinzugegeben. Bei festem BCDA-Medium wurde nach dem Autoklavieren der Lösung 25 mg l^{-1} Hygromycin B (sterilfiltriert) zugefügt.

PRMB und PRMT Medium

Für die Regeneration der Protoplasten wurden zwei verschiedene Medien hergestellt. Diese bestehen aus einer Bodenschicht und der oberen „Top“-Schicht.

PRMB (Bodenschicht)		PRMT („Top“-Schicht)	
Lösung B	10,0 ml l^{-1}	Lösung B	1,0 ml l^{-1}
Lösung C	10,0 ml l^{-1}	Lösung C	1,0 ml l^{-1}
Lösung D	10,0 ml l^{-1}	Lösung D	1,0 ml l^{-1}
TES	1,0 ml l^{-1}	TES	1,0 ml l^{-1}
D-Mannitol	60,0 g l^{-1}	D-Mannitol	8,0 g l^{-1}
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	12,5 mg l^{-1}	$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	12,5 mg l^{-1}
$CaCl_2$	219,0 mg l^{-1}	$CaCl_2$	219,0 mg l^{-1}
Diammoniumtartrat	920,0 mg l^{-1}	Diammoniumtartrat	92,0 mg l^{-1}
Agar-Agar	7,0 g l^{-1}	Agar-Agar	4,0 g l^{-1}

24.2 Pufferlösungen

Kaliumphosphat

0,1 M bis 1 M KH_2PO_4

0,1 M bis 1 M K_2HPO_4

Die Einstellung des pH-Werts erfolgte durch die Mischung beider Stammlösungen miteinander.

Britton Robinson Puffer pH 2-12 (nach Britton und Robinson 1931)

Borsäure	0,04 M
Essigsäure	0,04 M
Phosphorsäure	0,04 M

Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt.

Borsäure Borax Puffer pH 7-10

Borsäure	0,5 M
di-Natriumtetraborat-Decahydrat	0,5 M

Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt.

24.3 Bradford Lösung (nach Bradford 1976)

Coomassie Brillant Blue G 250	100 mg l^{-1}
96 % Ethanol p.a.	50 ml^{-1}
85 % *o*-Phosphorsäure	100 ml l^{-1}

Auffüllen auf 1 l mit Aqua demin., Lösung zweimal filtrieren.

24.4 Transformation von *Physcomitrium patens*

MMM Puffer pH 5,6

1 % MES	10,00 g l^{-1}
8,5 % Mannitol	850,00 g l^{-1}
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3,05 g l^{-1}

Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 5,6 erfolgte mit 4 M KOH.

PEG Transformationslösung

0,38 M Mannitol	70,0 g l^{-1}
0,1 M Calciumnitrat	23,6 g l^{-1}
40 % PEG 4000	400,0 g l^{-1}
1 M Tris pH 8,0	10,0 ml l^{-1}

TE Puffer (pH 8.0)

Tris	10 mM
Na_2EDTA	1 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt.

24.5 SDS-PAGE

Laemmli Probenpuffer

0,5 M Tris HCl, pH 6,8	0,24 ml ml^{-1}
Glycerin	0,40 ml ml^{-1}
SDS	80,00 mg ml^{-1}
β-Mercaptoethanol,	0,10 ml ml^{-1}
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

24.6 Agarose-Gelelektrophorese

6x Loading Dye Agarose

Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,03 % (w/v)
Glycerin	60 % (w/v)
EDTA	60 mM

24.7 Lösungen zur Isolierung von genomischer DNA

2x CTAB Puffer

CTAB	2,0 % (w/v)
Tris HCl (pH 8,0)	100,0 mM
EDTA (pH 8,0)	20,0 mM
NaCl	1,4 M
Polyvinylpyrrolidon (MW 40000)	1,0 % (w/v)

10x CTAB Puffer

CTAB	10,0 % (w/v)
NaCl	0,7 M

High Salt TE Puffer

Tris HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
NaCl	1 M

CTAB Präzipitationspuffer

CTAB	1 % (w/v)
Tris HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM

24.8 Lösungen zur Plasmidisolierung nach Qiagen Protokoll

Puffer P1

Tris HCl pH 8,0	50 mM
EDTA x 2 H_2O	10 mM
RNase A	100 µg ml^{-1}

Puffer P2

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Puffer N3 (pH 4,8)

Guanidin HCl	4,2 M
Kaliumacetat	0,9 M

Puffer PB

Guanidin HCl	5 M
Isopropanol	30 % (v/v)

Puffer PE

Tris HCl pH 7,5	10 mM
Ethanol	80 % (v/v)

Reinigungsmittel Säulenmaterial

HCl	1 M

Säulenregeneration (QBT Puffer)

NaCl	750 mM
MOPS pH 7,0	50 mM
Ethanol	15 % (v/v)
Triton X-100	0,15 % (v/v)

24.9 Lösungen für chromatographische Methoden

Metallchelatchromatographie über Ni-NTA (Tropfsäulen)

Bindepuffer

Kaliumphosphat Puffer (pH 8,0)	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM

Waschpuffer

Kaliumphosphat Puffer (pH 8,0)	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM

Elutionspuffer

Kaliumphosphat Puffer (pH 8,0)	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

Metallchelatchromatographie über Ni-NTA (Äkta® FPLC System)

Equilibrierungspuffer

Natriumphosphatpuffer (pH 8,0)	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM

Waschpuffer

Natriumphosphatpuffer (pH 8,0)	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM

Elutionspuffer

Natriumphosphatpuffer (pH 8,0)	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

24.10 Materialien und Geräte

24.10.1 Chemikalien

Name	Hersteller
1-Naphthylessigäure, NAA	Duchefa
2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Sigma
4-Hydroxyzimtsäure	Merck
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP)	Roth
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Thermo Scientific
Aceton	Roth
Acetonitril	Roth
Agar-Agar	cero
Agarose NEEO	Roth
Aluminiumsulfat ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 16\ H_2O$)	Roth
Amidoschwarz	Alfa-Aesar

Name	Hersteller
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid Dihydrat	Roth
Calciumnitrat Tetrahydrat	Roth
Cellophan	Bringmann Folia Paper
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth
Coenzym A, Trilithiumsalz Dehydrat, CoA	Applichem
Coniferylalkohol	Fluka
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka
D-(+) Biotin	Merck
D-(+) Glucose Monohydrat	Roth
Diammonium-(+)-Tartrat	Honeywell
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Roth
Dimanin C	Bayer
Dimethylsulfoxid	Roth
Di-Natriumhydrogencitrat-1,5-hydrat	Riedel de Haen
Dinatriumtetraborat-Decahydrat	Merck
D-Phenylalanin	Sigma
D-Tyrosin	Roth
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titriplex III)	Roth
Eichpufferlösung pH 10,0	Roth
Eichpufferlösung pH 4,0	Roth
Eichpufferlösung pH 7,0	Roth
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Fluka
Eisessig	Roth
Eriodictyol	Roth
Ethanol p.a.	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylacetat	Labochem
Feruloyl-CoA	eigene Synthese
Flüssigstickstoff	Linde
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidin HCl	Roth
Guanidinthiocyanat	Roth
Haushaltzucker	Aldi Nord
Hefeextrakt	Roth

Name	Hersteller
HEPES	Roth
L-Histidin	Roth
Hygromycin B	Alfa Aesar
Imidazol	Roth
Indol-3-Essigsäure, IES	Duchefa
Isopropanol	Merck
Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumacetat	Acros
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumhydroxid	Merck
Kaliumjodid	Merck
Kaliumnitrat (KNO_3)	Roth
Kinetin (6-Furfurylaminopurin)	Duchefa
Kobalt(II)chlorid	Merck
Kupfersulfat Pentahydrat	Fluka
Laccase aus *Rhus vernicifera*	Sigma
Laurylsarcosin	Sigma Aldrich
L-Glutathion reduziert	Biochemika
Lithiumchlorid	Roth
L-Phenylalanin	Roth
L-Tyrosin	Merk
Lysozym	Roth
Magermilchpulver	Spinnrad
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Malonyl-CoA	Sigma, Cayman Chemical
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	Duchefa
Mannitol	Alfa Aesar
MES	Roth
Methanol	Fisher Chemical
myo-Inosit	Sigma, Roth
N,*N*,*N'*,*N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
NAD^+	Biomol
$NADH_2$	Roth
$NADP^+$	Roche
$NADPH_2$ Tetranatriumsalz	Roche, Roth
Naringenin	Roth
Naringenin-Chalkon	Phytolab

Name	Hersteller
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	VWR
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Roth
Natriumhydroxid	Roth
N-Cyclohexyl-2-Aminoethansulfonsäure (CHES)	Roth
N-Cyclohexyl-3-Aminopropansulfonsäure (CAPS)	Roth
Nicotinsäure	Duchefa
Nitrotetrazoliumblauchlorid	Roth
NZ-Amine	Sigma
o-Phosphorsäure 85 %	Roth
4-Cumaroyl-CoA,	eigene Synthese
4-Cumarsäure	Fluka
PEG 4000	Roth
Phenol, Citratpuffer-gesättigt	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Pyridoxin x HCl	Duchefa
Rinderserumalbumin Fraktion V Protease-frei	Roth
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth
Salzsäure	Fisher Chemical
Tetracyclin	Sigma
Thiaminhydrochlorid	Roth
Titriplex III	Roth
Trichloressigsäure	Roth
Trichlormethan, Chloroform	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Triton X 100	Roth
Trypton	Roth
t-Urocansäure	Tokyo chemical industry
Tween 20	Serva
Wasserstoffperoxid 30 Gew.% Lsg.	Sigma
Xylencyanol FF	Fluka
Yeast nitrogen base (YNB2)	Pronadisa
Zeocin	Invitrogen
Zinksulfat Heptahydrat	Duchema
Zinn(II)-chlorid Dihydrat	Roth
β-Mercaptoethanol	Merck

24.10.2 Reagenzien und Kits

Name	Hersteller
6x His Tag Antikörper	Invitrogen
Accuprime® Polymerase	Invitrogen
Chromabond C18ec	Macherey-Nagel
Cut Smart Puffer (10x)	Biolabs
DNA from fish sperm	Serva
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roth
Driselase	Sigma
GeneRuler™1 kb DNA Ladder	Fisher Scientific
GeneRuler™DNA Ladder Mix	Fisher Scientific
Goat Anti-mouse IgG-Fc Alk. Phosphatase conjugate	Invitrogen
GoTaq®Flexi DNA-Polymerase Kit (5 U μl^{-1})	Promega
HD Cloning Kit	Takara Bio USA, Inc.
horseradish peroxidase, HRP (560 U mg^{-1})	Fluka
KOD Hot Start Polymerase (1 U μl^{-1})	Novagen
KOD® Polymerase	Sigma Aldrich
NucleoSpin® Extract II Kit and PCR Clean up	Macherey-Nagel
PD-10 Columns Sephadex G-25M	GE Healthcare
Phusion® Polymerase (2 U μl^{-1})	New England Biolabs
Polyvinylidendifluorid-Blottingmembran	Applied Biosystems
QIAGEN PCR Cloning Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
qScript cDNA Super Mix	Quanta Biosciences
Restriktionsenzym *Bam*HI	Thermo Scientific
Restriktionsenzym *Bst*XI	Fermentas
Restriktionsenzym *Eco*RI	Thermo Scientific
Restriktionsenzym *Nde*I	New England Biolabs
Restriktionsenzym *Not*I	Thermo Scientific
Restriktionsenzym *Sac*I	Thermo Scientific
Restriktionsenzym *Swa*I	New England Biolabs
Restriktionsenzym *Xho*I	New England Biolabs
Ribonuklease A aus Rinderpankreas	Fluka
ROTI®Garose-His/Ni HP-Kartusche	Roth
RotiGarose His/ Ni Beads	Roth
Rotimark Tricolor	Roth
SMARTer® RACE 5´/3´Kit	Takara Bio USA, Inc.
T4 DNA-Ligase Kit	New England Biolabs

24.10.3 Genotyp von Laborstämmen

Stamm	Genotyp
E. coli EZ (Qiagen)	*E. coli* str. [F'::Tn10(Tc^r) proA$^+$B$^+$ lacI^{q}ZΔM15] recA1 end A1 hsdR17(r_{K12}^- m_{K12}^+) lac glnV44 thi-1 gyrA96 relA1
E. coli SoluBL21 (amsbio)	F$^-$ompT hsdSB (rB$^-$ mB$^-$) gal dcm (DE3)†
SuperMan5-20 (BioGrammatics, Inc.)	GlycoSwitch® *Pichia* (*Komagataella phaffii*) Genotype: och1-Δ1, GAP-mannosidaseHDEL, pep4-Δ1

24.10.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	AL02-02-100	Advantage-Lab
	Systec VX-95	Systec GmbH
Benchtop homogeniser	Minilys®	Bertin Instruments
Blottingkammer	Semi Dry Blotter PROfessional	Roth
Bunsenbrenner	Flammy S	Schütt
Eismaschine	AF 80	Scotsman
	RF-0244A	Manitowoc
Feinwaage	Explorer EX2250	OHAUS
Gefriertrockner	Christ L1	B. Braun Biotech
Gefriertruhe (-80°C)	C585 Innova	New Brunswick Scientific
Geldokumentationssystem	FAS-Digi	Nippon Genetics
Homogenisator	TH220	OMNI International
Horizontale Agarosegel-elektrophorese Kammer	multiSUB Midi	Cleaver Scientific
	Agagel Mini Biometra	Biomed. Analytik GmbH

HPLC System	Chromaster 5160 Pump + Organizer Chromaster 5280 Auto Sampler Chromaster 5310 Column Oven Chromaster 5430 Diode Array Detector	VWR/Hitachi
	Spectra System P 400 Spectra System SN 4000 Spectra System SCM 1000 Spectra System UV 1000	Thermo Scientific
HPLC Säulen	Equisil ODS-Säule (4 mm ø, 250 mm Länge, 20 mm Vorsäule)	Dr. Maisch HPLC GmbH
	ROTI®Garose-His/Ni NTA-Kartuschen (HP-5ml)	Roth
	Hypersil HyPURITY™ Elite C18	unbekannt
Laminarfluss Arbeitsbank	Sanlaf Mars	Labogene
	Laminar Flow Workstation	Microflow
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instr.
Netzgeräte	E835 E143 EV2310 EV3020	Consort
PCR Thermocycler	MyCycler	Bio-Rad
Peltier	JUMO dTRON 308	Analytik Jena
pH-Elektrode	Accumed Basic	Fisher Scientific
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
	Specord 200 plus	Analytik Jena
Pipetten	PIPETMAN Classic	Gilson
	Eppendorf Research® plus Einkanalpipetten, variabel	Eppendorf
Proteinelektrophoresekammer	Mini Protean® 3 Cell	Bio-Rad
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Reinstwasseranlage	OmniaPure	Stakpure GmbH
Schüttelinkubator	Ecotron	Infors HT
	10X 400	Gallenkamp
Siebe	40, 70, 100 µM	Sarstedt
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
	uniTHERMIX 2	LLG Labware
Trockenofen	U40	Memmert
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin

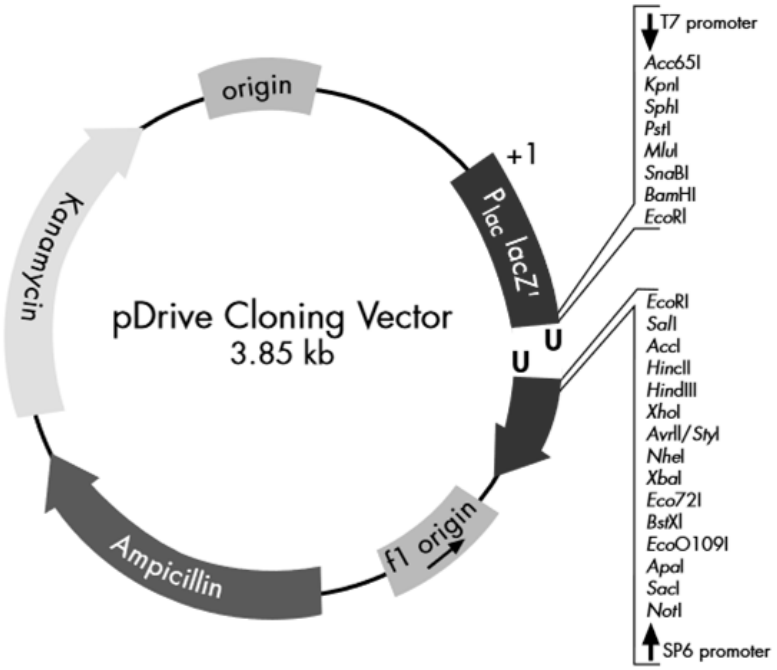
Ultraschallhomogenisator	UP 200S	Dr. Hielscher
Vakuumpumpe	MZ 2C NT	Vacuubrand
	Drehschieberpumpe P4Z	Ilmvac GmbH
Vakuumzentrifuge	RVC 2-18 CDplus	Christ
Wasserbäder	SW	Julabo
	Thermomix ME	B. Braun Biotech.
	Thermomix 7P	
Wippschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instr.
	Rocker 35 EZ	Labnet International
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal Kammer	unbekannt
Zellkulturschüttler	Certomat SII	B. Braun Biotech.
	RS-306	Infors AG

24.10.5 Verwende Software und Datenbänke

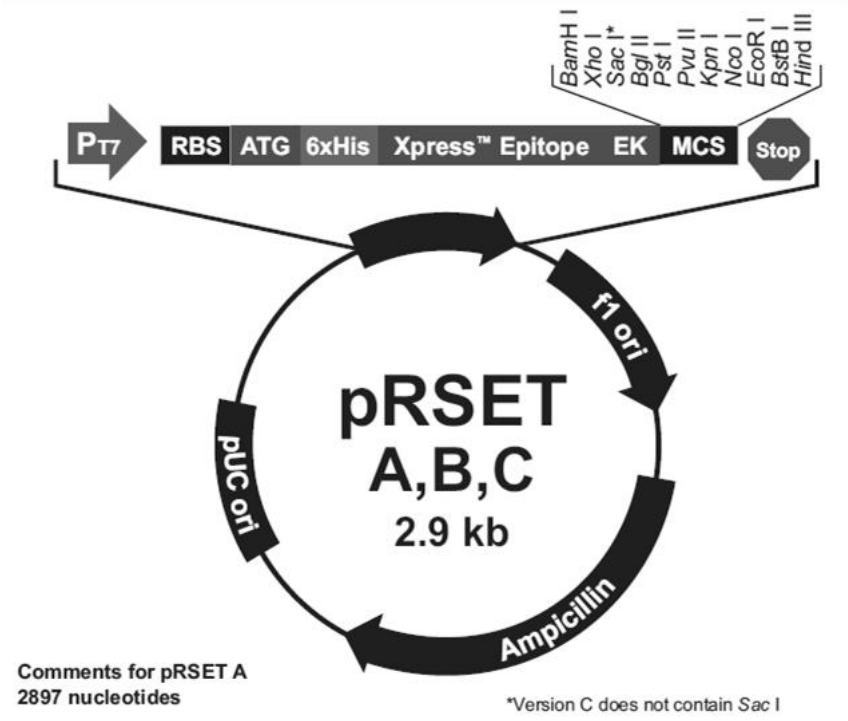
Programm	**Hersteller**
ASpect UV Version 1.4.4	Analytik Jena 2020
Blast	National Center for Biotechnology Information
ChemDraw 16.0	Perkin Elmer
Chromaster System Manager D-7000	Hitachi
CLC Sequence Viewer 5	QIAGEN Aarhus A/S
Clone Manager 8	Sci Ed Software LLC
Graph Pad Prism 5	GraphPad
Microsoft® Office Professional Plus 2016	Microsoft Corporation
Snap Gene Viewer 4.3.3	Snapgene
Expasy Translate	Programm zur Übersetzung von Nukleotid-sequenzen in Proteinsequenzen

24.10.6 Vektorkarten

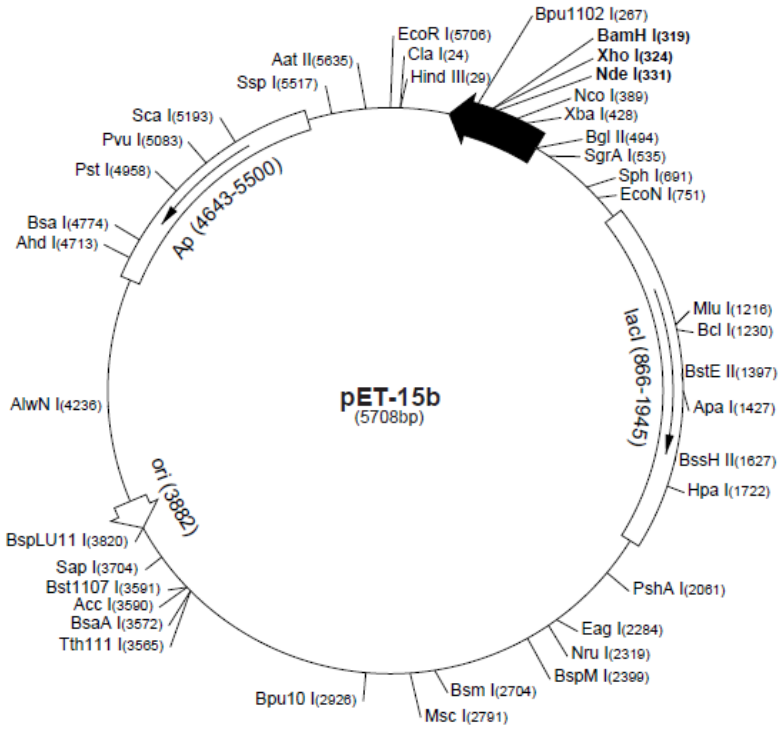
pDrive (Qiagen)



pRSET C (Invitrogen)



pET-15b (Novagen)



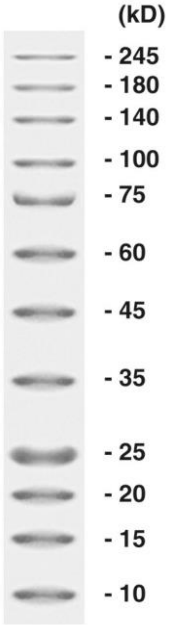
24.10.7 Liste verwendeter Primer

Primer Name	Sequenz	Primerform	T_M (°C)
	Phenylalanin Ammoniak-Lyase		
PAL-F1	AAGGATCCRTTGAAYTGGGGTGTDGCAGCGG	degeneriert	71,3
PAL-F2	TRACGGGAGYCACCTTGATGAGGTGAAGA	degeneriert	69,5
PAL-R1	CTAACATATTGGAAGAGGTRCACCATTCC	degeneriert	64,6
PAL-5RACE rev1	CTTCGTAGTGGGACCGGTTTAGCTCCGA	RACE	69,5
PAL-5RACE-rev2	CATCTTGGTTGTGTTGTTCGGCGCTTTG	RACE	66,6
PAL1-Nde I F1	ATACATATGGAAAACGGTAATCATGTAAATGGAG	Volllänge	61,6
PAL1- XhoI-R1	ATACTCGAGCTAACATATTGGAAGAGGTACACCA	Volllänge	67,1
PAL1-Nde I F2	ATACATATGGAAAACGGTAATCATGTAAATGGAGTCGCCGTTC	Volllänge	70,4
PAL1-XhoI-R2	ATACTCGAGCTAACATATTGGAAGAGGTACACCATTCCGCCCTTG	Volllänge	74,0
PAL1-Xho-F1	CTCGAGACATGGAAAACGGTAATCATGTAAATG	Volllänge	65,8
PAL1-EcoR1-r1	AGAATTCCTAACATATTGGAAGAGGTACACCA	Volllänge	64,4
PAL2-3RACE-for1	CTCAATGCCGAACAGGCCTTCACCCTC	RACE	69,5
PAL2-5RACE-rev1	AGCGAGGGTGAAGGCCTGTTCGGCATTGAG	RACE	72,2
PAL2_Xho-F1	ATACTCGAGATGGCGAACAACAACCGACACG	Volllänge	69,5
PAL2_Xho-R1	ATACTCGAGCTAACATATTGGAAGAGGTGCACCATTC	Volllänge	69,5
PAL2_Xho-f3	ATACTCGAGACATGGCGAACAACAACCGACA	Volllänge	68,2
PAL2-EcoRI-r1	AGAATTCCTAACATATTGGAAGAGGTGCACCAT	Volllänge	65,8
	Coniferylaldehyd Dehydrogenase		
SIL-CAD-F1	GGCATGACTGTTTATCCCGTTGTTCCTG	Teillänge	66,6
CAD-random-Rev2	CCGGCAACATCCACDACAAAACGGTATC	degeneriert	67,1
CAD-SIL-F2	CCCGTTGTTCCTGGGCATGAAATTG	Teillänge	64,6
CAD-F1	ATGGCAGCSSCSGSCYCWWCTGGG	degeneriert	65,4
CAD-R1	TTGCTRCCRGCRACATCRACRACGA	degeneriert	69,5
CAD-Sil-midR1	CGAACTAGCTGCAGACTGCATTTGCTCTGG	Teillänge	69,5
CAD-SmNdeI-f1	ATACATATGGCGAAATCTCCAGAGACGGAAC	Volllänge	66,8
CAD-SmBamH1-r1	TAGGATCCTTACGGAGCTTTGAGGGAATTG	Volllänge	66,8
	Cinnamoyl-CoA Reduktase		
CCR-F1	GCCGGYGGCTTCATMGTCTTCATGG	degeneriert	67,9
CCR-F2:	GGAGGTGDCCTTTSTCYTGBAGGCT	degeneriert	61,3
CCR-R1:	GAAYTCCARMCCCAARTCTTTTAGC	degeneriert	67,1
CCR-3RaceF1	GATGATCCTGAACAAATGGTGGAGCC	RACE	64,8
CCR-5Race-R1	CGGCTCCACCATTTGTTCAGGATCATC	RACE	66,5
CCR-Nde I-fw	ATACATATGTCTCCGGCATCCAACCAAATC	Volllänge	65,4
CCR-XhoI-rev	ATACTCGAGTTAATTAGACTGGATACGGAT	Volllänge	62,7
	Chalkonsynthase		
CHSPhu-3for	AGAGAAATTCAAGCGCATGTGTGACAAGTCTATGATAAGA	Phusion	
CHSPhu-5rev	TCTTATCATAGACTTGTCACACATGCGCTTGAATTTCTCT	Phusion	

Primer Name	Sequenz	Primerform	T_M (°C)
CHS-Nde-f	ATACATATGGCATCCTCATCAATTGATATTG	Volllänge	61,6
CHS-Xho-R2	ATACTCGAGTCATTCATGATTAATTACGACTTGTT	Volllänge	63,6
CHS-infuNdeI-F1	CGCGGCAGCCATATGGCATCCTCATCAATTGATATTG	Volllänge	71,7
CHS-infuXhoI-R1	TTAGCAGCCATACTCGAGTCATTCATGATTAATTACG	Volllänge	67,2
	Dirigierende Proteine†		
5-DIR1-FL	ATAGAATTCATGAGTTCTAAGTATCAAAACTCAACAC	Volllänge	59.3
3-DIR1+2-FL	ATAGCGGCCGCCCAACAYTCATAGAACTTWATGTCAAC	Volllänge	59.7
5-DIR2-FL	ATAGAATTCATGAGTGTAAAAACAAGTTCAAATATAG	Volllänge	56.3
	Laccase†		
5-LAC-FL	ATAGAATTCATGGATCGTGTGTTCACCACCATTGC	Volllänge	64.8
3-LAC-FL	ATAGCGGCCGCACACACGGGTAAGTCTAGTGGTGG	Volllänge	64.4
	Peroxidase†		
5-POX-FL (EcoRI)	ATAGAATTCATGGCTCGTTCGTCGTCGTCTTAC	Volllänge	64.4
3-POX-FL (NotI)	ATAGCGGCCGCATTAGTTCTTCTGCAATTCGTCCGAACC	Volllänge	63.7

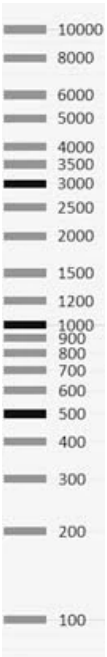
24.10.8 Verwendete Molekularmarker

Roti Mark Tricolor (8271.1)



GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0331)

(bp)



† Die Primer für die Dirigierenden Proteine, Laccase und Peroxidase wurden von L. Poppe übernommen und enthielten eine Signalpeptidsequenz und waren für die Expression im pPICZα A Vektor vorgesehen.

IV. Ergebnisse

1. Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion und degenerierten Primern aus konservierten Regionen bereits bekannter PAL-Sequenzen konnten zunächst 672 Nukleotide einer Phenylalanin Ammoniak-Lyase aus einem *Silybum marianum* Sämling (Pflanzenwachstum bis ca. 10 cm) amplifiziert werden. Durch eine RACE-PCR konnten anschließend die 5'- und 3'-Enden von zwei verschiedenen PAL Isoformen identifiziert werden. Die folgende Abb. 14 zeigt die Volllängen-Amplifikate der PAL Isoformen 1 und 2.

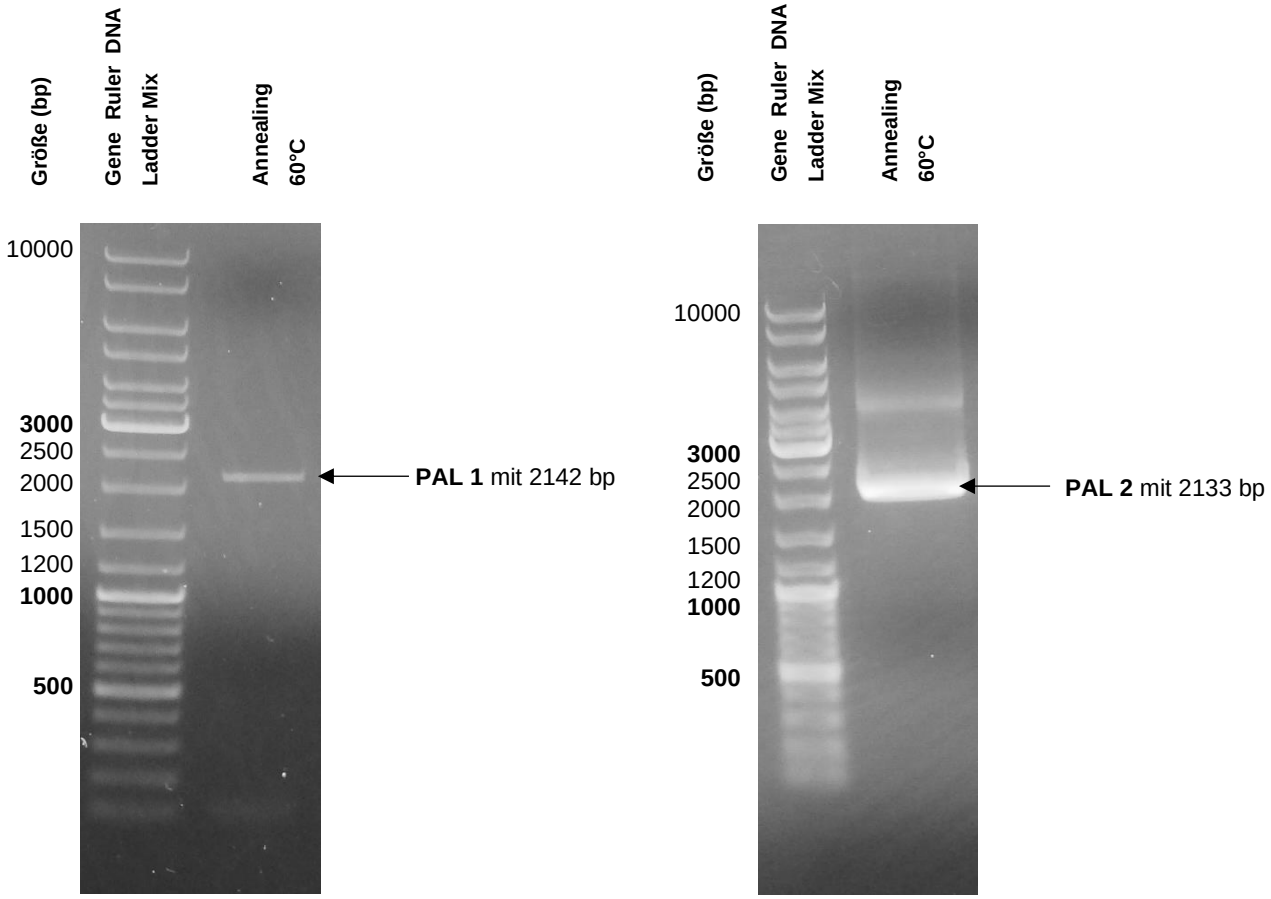


Abb. 14 Amplifikation der Volllängensequenzen der Phenylalanin Ammoniak-Lyase Isoformen 1 und 2.
Links: PAL 1 Volllänge; rechts: PAL 2 Volllänge

Ein Vergleich der beiden Sequenzen miteinander zeigte eine Identität von 85 % auf Basis der Nukleotidsequenzen. Zur besseren und übersichtlicheren Darstellung werden die Ergebnisse beider Isoformen nachfolgend in getrennten Kapiteln dargestellt.

1.1 Phenylalanin Ammoniak-Lyase Isoform 1 (PAL 1)

Die PAL 1 besitzt ein offenes Leseraster von 2142 Nukleotiden, welches codierend ist für 713 Aminosäuren. Das errechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 77440 Dalton und der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,82.

```
atggaaaacggtaatcatgtaaatggagtcgccgttctgaatgagttttgcatcaaggat
 M  E  N  G  N  H  V  N  G  V  A  V  L  N  E  F  C  I  K  D
ccgttgaactggggtgtggcagctgaggcactcaccggaagccaccttgatgaggtgaag
 P  L  N  W  G  V  A  A  E  A  L  T  G  S  H  L  D  E  V  K
aagatggtggccgagttcaggaagccggtggtgaagctgggaggagagacactgacggtg
 K  M  V  A  E  F  R  K  P  V  V  K  L  G  G  E  T  L  T  V
tctcaggtggccggaatcgcagctgctaatgacagcaacaccgtgaaggtggagctatcg
 S  Q  V  A  G  I  A  A  A  N  D  S  N  T  V  K  V  E  L  S
gaatcagctagggctggggtgaaggccagcagtgattgggttatggagagcatgaggaaa
 E  S  A  R  A  G  V  K  A  S  S  D  W  V  M  E  S  M  R  K
ggaaccgatagttatggtgtcaccaccggctttggcgccacctctcaccggagaaccaag
 G  T  D  S  Y  G  V  T  T  G  F  G  A  T  S  H  R  R  T  K
caaggtggtgctctgcaaaaggagctcattagatttttgaacgccggaatattcggcaat
 Q  G  G  A  L  Q  K  E  L  I  R  F  L  N  A  G  I  F  G  N
ggaacggaatcaagccacactcttccacattcggcaacaagggccgccatgatcgtcaga
 G  T  E  S  S  H  T  L  P  H  S  A  T  R  A  A  M  I  V  R
attaacaccctcctccagggttactccggcatccgatttgagatcttggaagccattacc
 I  N  T  L  L  Q  G  Y  S  G  I  R  F  E  I  L  E  A  I  T
aagttccttaaccaaaatgtcaccccttgtttacccctccgtggtacaatcaccgcctcc
 K  F  L  N  Q  N  V  T  P  C  L  P  L  R  G  T  I  T  A  S
ggtgacctcgttcctttgtcttatatcgccggacttctcaccggccgtcctaactccaaa
 G  D  L  V  P  L  S  Y  I  A  G  L  L  T  G  R  P  N  S  K
gcagttggccccaccggagaaatccttaatgctgaagaagctttcgcccaagccggtgtc
 A  V  G  P  T  G  E  I  L  N  A  E  E  A  F  A  Q  A  G  V
gaaggtgggttcttcgagttgcagccaaaagaagggctagcacttgttaacggcaccgcc
 E  G  G  F  F  E  L  Q  P  K  E  G  L  A  L  V  N  G  T  A
gtgggttccggtatggcatccatggtgctttttgaagctaatgtgcttgctttgttgtcg
 V  G  S  G  M  A  S  M  V  L  F  E  A  N  V  L  A  L  L  S
gaagtcttgtcggctatctttgccgaagttatgcaaggaaagccagagttcaccgatcat
 E  V  L  S  A  I  F  A  E  V  M  Q  G  K  P  E  F  T  D  H
ttgacccacaaattaaagcatcaccctggccaaatcgaagctgcagcgatcatggaatac
 L  T  H  K  L  K  H  H  P  G  Q  I  E  A  A  A  I  M  E  Y
atcttggatggaagcgattacgttaaggctgcacaaaaggtccatgaaatggacccattg
 I  L  D  G  S  D  Y  V  K  A  A  Q  K  V  H  E  M  D  P  L
cagaaaccaaaacaagatcgctacgctctccgaacatcaccccaatggctcggaccacaa
 Q  K  P  K  Q  D  R  Y  A  L  R  T  S  P  Q  W  L  G  P  Q
atcgaagtcatccgatcagccaccaaaatgatcgagagagagatcaattccgtcaaggac
 I  E  V  I  R  S  A  T  K  M  I  E  R  E  I  N  S  V  K  D
aacccattgatcgatgtttcaagaaacaaagccttacatggtggaaacttccaaggaacc
 N  P  L  I  D  V  S  R  N  K  A  L  H  G  G  N  F  Q  G  T
ccaattggtgtttccatggataacacacgtttagccatcgccgccatcggaaaactcatg
 P  I  G  V  S  M  D  N  T  R  L  A  I  A  A  I  G  K  L  M
ttcgctcaattctccgagcttgtaaacgatttctacaacaacgggttgccgtcgaatctc
 F  A  Q  F  S  E  L  V  N  D  F  Y  N  N  G  L  P  S  N  L
tccggcggccgtaatccaagtttggattacgggttcgaaggtggagaaatcgccatggct
 S  G  G  R  N  P  S  L  D  Y  G  F  E  G  G  E  I  A  M  A
tcatactgttcagagctccagtttcttgcaaatccggtgaccaaccacgttcaaagcgcc
 S  Y  C  S  E  L  Q  F  L  A  N  P  V  T  N  H  V  Q  S  A
gaacaacacaaccaagatgtcaactctttgggtttgatttccgcaagaaaaacagccgaa
 E  Q  H  N  Q  D  V  N  S  L  G  L  I  S  A  R  K  T  A  E
gccgtcgatatcttaaaactcatgtcatccacatacttagtagctctttgccaatccgtc
 A  V  D  I  L  K  L  M  S  S  T  Y  L  V  A  L  C  Q  S  V
gatttacgacatttggaagaaaacatgaaatccacagtgaagaacaccgtaagccaagtc
 D  L  R  H  L  E  E  N  M  K  S  T  V  K  N  T  V  S  Q  V
```

```
gccaagaaggtcttaaccatgggcgccaatggcgaactccacccatcaagattctgcgag
 A  K  K  V  L  T  M  G  A  N  G  E  L  H  P  S  R  F  C  E
aaagacttacttcgcgtggtcgatcgcgaatacgtcttcgcctacatcgacgacccatgc
 K  D  L  L  R  V  V  D  R  E  Y  V  F  A  Y  I  D  D  P  C
agcgccacctacccattgatgcagaaactccgacaagtcctcgttgaccacgccctaaac
 S  A  T  Y  P  L  M  Q  K  L  R  Q  V  L  V  D  H  A  L  N
aacggcgagactgagaagaacacaaacacctccatcttccaaaagatcgctactttcgaa
 N  G  E  T  E  K  N  T  N  T  S  I  F  Q  K  I  A  T  F  E
gacgaattgaaagccattttacccaaagaagtcgaaggtgttagaatcgcatacgaatct
 D  E  L  K  A  I  L  P  K  E  V  E  G  V  R  I  A  Y  E  S
gattcattatcgattcccagcaggatcaaagcttgtagatcatacccattatacaggttc
 D  S  L  S  I  P  S  R  I  K  A  C  R  S  Y  P  L  Y  R  F
gtaagagaggagctcggcggtgggttcttgaccggcgagaaggtgacttcgccgggagaa
 V  R  E  E  L  G  G  G  F  L  T  G  E  K  V  T  S  P  G  E
gagttcgataaggttttcacggccatgtgcaaaggtgaaatcattgatccattgttggaa
 E  F  D  K  V  F  T  A  M  C  K  G  E  I  I  D  P  L  L  E
tgtgttcaagggcggaatggtgtacctcttccaatatgttag
 C  V  Q  G  R  N  G  V  P  L  P  I  C  -
```

Die farbigen Markierungen kennzeichnen wichtige Bereiche im PAL-Protein: Die Phenylalanin Ammoniak-Lyasen besitzen eine konservierte Signatur (gelb markiert) die auch bei den Histidin Ammoniak-Lyasen vorkommen (Wu et al. 2014). Innerhalb dieser Sequenz befindet sich eine Ala-Ser-Gly Tripeptidsequenz (grün markiert), welche für die Ausbildung des 4-Methyliden-imidazol-5-on (MIO) verantwortlich ist. Bei dem rosa-unterlegten Sequenzabschnitt handelt es sich vermutlich um die kurze äußere Deckelschleife. Der grau-unterlegte Sequenzabschnitt beschreibt vermutlich die Abschirm-Domäne (Jun et al. 2018).

Die NCBI Datenbank Analyse durch das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) zeigte Ähnlichkeiten mit anderen PAL-Sequenzen aus unterschiedlichen Arten der Asteraceae. Die fünf höchsten Ähnlichkeiten zeigt die nachfolgende Tabelle 2 (Stand Februar 2021).

Tabelle 2 NCBI Datenbank Analyse für die PAL 1 sortiert nach absteigender Identität/Übereinstimmung.

Nr.	Organismus	Identität	Sequenzlänge (bp)	EMBL Sequenz ID
1	*Cynara cardunculus* var. *scolymus*	93 %	2401	XM_025130484.1
2	*Saussurea involucrata*	90 %	2405	KR811213.1
3	*Lactuca sativa*	87 %	2426	XM_023889122.1
4	*Gerbera jamesonii* cultivar linglong	86 %	2470	MH708527.1
5	*Ixeris dentata var. albiflora*	85 %	2136	KU724084.1

1.1.1 Expression der PAL 1 in *Escherichia coli*

Da eine Expression des PAL 1 Gens im Vektor pET15b geplant war, wurden an dem 5`-Ende der Sequenz eine NdeI- und am 3`-Ende eine XhoI Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die Expression der in pET15b eingebrachten PAL 1 Sequenz in SoluBL21 Zellen war zwar erfolgreich, jedoch war die Proteinausbeute äußerst gering. Darüber hinaus konnte keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Folglich wurde eine Ligation in den pRSET C Vektor angestrebt, die sich jedoch als schwierig erwies. Deswegen wurde hierfür die In-Fusion homologe Rekombinationsmethode verwendet. Als Ausgangsmaterial diente hierfür die bereits ligierte PAL 1 Volllänge im pET15b Vektor. Zunächst wurde mit Hilfe von speziell modifizierten Volllängenprimern eine In-Fusion Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Die Primer enthielten neben einer überlappenden Sequenz des pRSET C Vektors eine passende Restriktionsschnittstelle (5`-Ende: NdeI; 3`-Ende: EcoRI) und die ersten bzw. letzten 15 Basenpaare der PAL 1 Sequenz. Die darauffolgende In-Fusion Ligation in den pRSET C Vektor, sowie die Transformation und Expression in den SoluBL21 Zellen waren erfolgreich.

Aufgrund der sechs hintereinander liegenden Histidinreste am *N*-terminalen Anfang des heterolog exprimierten Proteins ließ sich dieses nachfolgend durch Chromatographie über eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (NTA-Ni) isolieren und aufreinigen. Abb. 15 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel mit den einzelnen Aufreinigungsfraktionen. Hierbei konnten pro Expression Proteinmengen von bis zu 50 mg pro 100 ml Bakterienkultur erzielt werden.

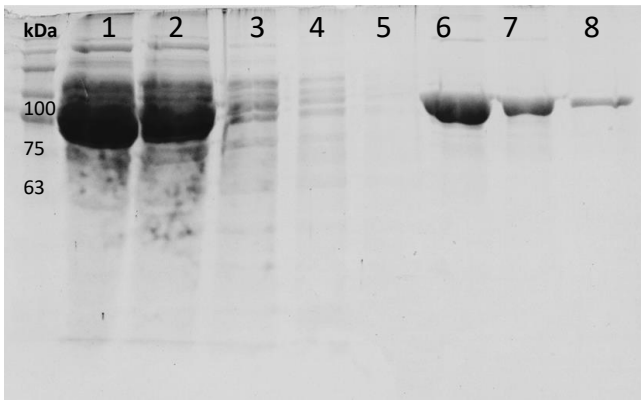


Abb. 15 SDS-PAGE der Fraktionen einer Aufreinigung der mit *N*-terminalem 6x-His-tag versehenen PAL 1 über Metallchelatchromatographie, 1. Rohextrakt, 2. Durchfluss, 3. Waschen I, 4. Waschen II, 5. Waschen III; 6. Elution I, 7. Elution II, 8. Elution III

1.1.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes

Für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurden unterschiedliche Puffersysteme getestet. Die höchste spezifische Enzymaktivität von 35 mkat kg^{-1} wurde im Borsäure-Borax-Puffer bei pH 7,7 ermittelt (Abb. 16). Im Tris/HCl-Puffer liegt das pH-Optimum bei pH 8,9 mit einer spezifischen Aktivität von 34 mkat kg^{-1}.

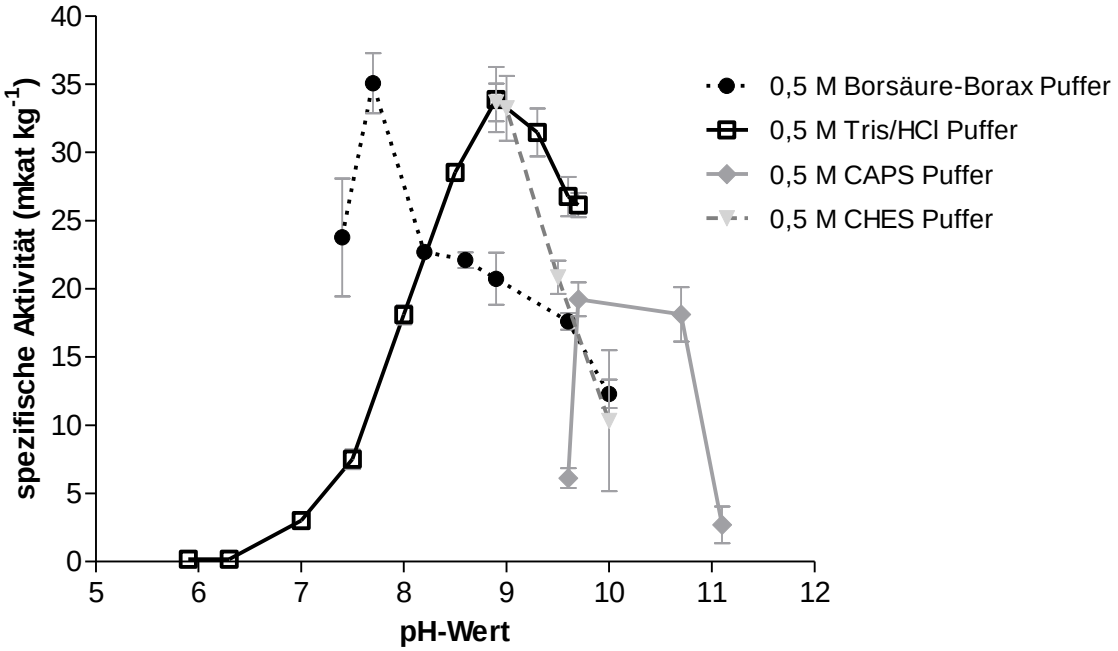


Abb. 16 PAL 1: Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes für PAL Isoform 1 (n = 3 ± Standardfehler).

Die höchste enzymatische Aktivität im CHES-Puffer liegt bei pH 9,0 und im CAPS-Puffer bei pH 9,7. Aufgrund der gesundheitsschädlichen Eigenschaften von Borsäure und Natriumtetraborat wurde für die nachfolgenden enzymatischen Charakterisierungen ein Tris/HCl-Puffer pH 8,9 verwendet.

1.1.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurde bei der Isoform 1 ein 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 9,0 verwendet. Die nachfolgende Abb. 17 zeigt eine hohe spezifische Aktivität von 88 mkat kg^{-1} am Temperaturoptimum von 60 °C.

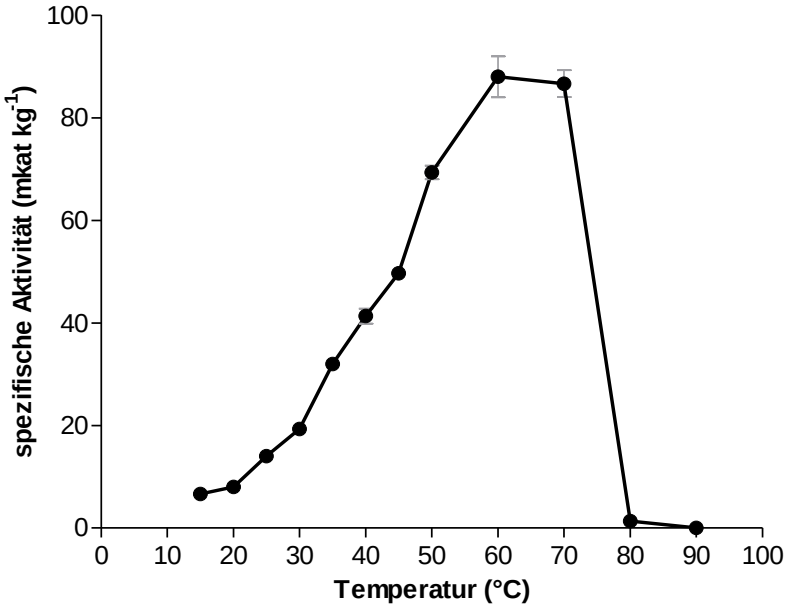


Abb. 17 PAL 1: Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur der PAL Isoform 1 (n = 3 ± Standardfehler).

1.1.4 Enzymkinetik: L-Phenylalanin

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte photometrisch als Dreifachbestimmung mit drei biologischen Replikaten. Die niedrigste L-Phenylalaninkonzentration betrug 5 µM, die größte 2000 µM. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für das Substrat L-Phenylalanin betrug bei der Michaelis-Menten-Auftragung 17,86 ± 1,64 mkat kg^{-1}. Der K_m-Wert für das Substrat L-Phenylalanin konnte mit 12,11 ± 1,96 µM bestimmt werden (Abb. 18, links).

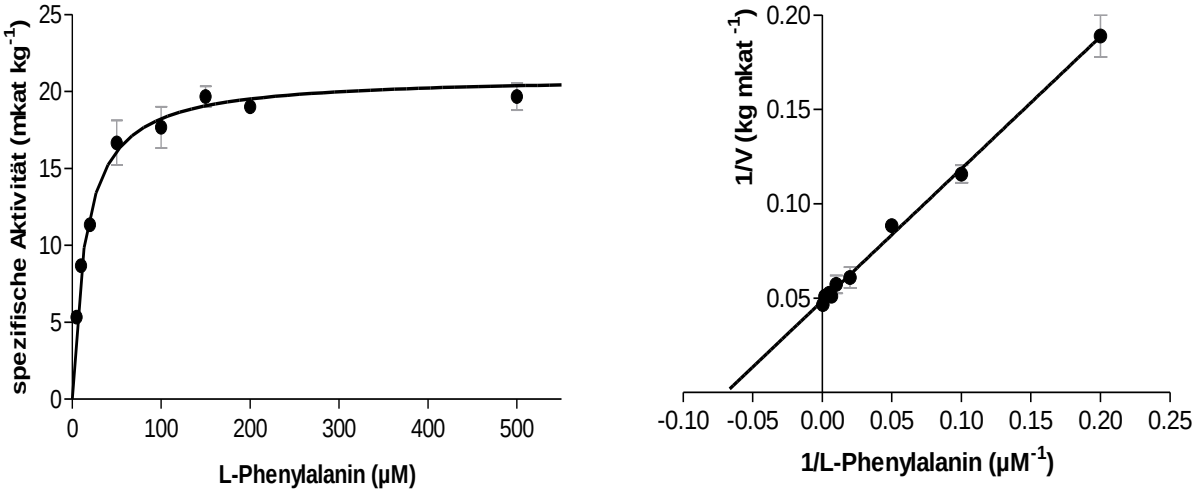


Abb. 18 PAL 1: links: Substratsättigungskurve für L-Phenylalanin zur Bestimmung des K_m-Werts (Der Messwert bei 2 mM wurde aus der graphischen Darstellung herausgenommen.), rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Nach der Linearisierung durch eine doppelt reziproke Auftragung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung, Abb. 18, rechts) konnte ein K_m-Wert für L-Phenylalanin von 12,25 ± 1,39 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 17,66 ± 1,53 mkat kg^{-1}.

Ein weiteres Linearisierungsverfahren zur Bestimmung von K_m und V_{max} bietet das Hanes-Woolf-Diagramm. Hierbei wird die Substratkonzentration durch die spezifische Aktivität dividiert und als Funktion gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Der Anstieg der Regressionsgeraden beträgt $1/V_{max}$, der Schnittpunkt mit der negativen X-Achse ist $-K_m$, der Schnittpunkt mit der Y-Achse entspricht K_m/V_{max}. Für die PAL 1 konnte für L-Phenylalanin ein K_m-Wert von 13,45 ± 4,39 µM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 17,89 ± 1,99 mkat kg^{-1} bestimmt werden.

Zusammenfassend konnten mit der photometrischen Bestimmungsmethode und der unterschiedlichen Auswertungs- und Darstellungsmethoden die folgenden Werte für Phenylalanin Ammoniak-Lyase Isoform 1 und das Substrat L-Phenylalanin ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk**[1]	**Hanes-Woolf**[1]
K_m (µM)	12,11 ± 1,96	12,25 ± 1,39	13,45 ± 4,39
V_{max} (mkat kg^{-1})	17,86 ± 1,64	17,66 ± 1,53	17,89 ± 1,99
k_{cat} (s^{-1})	1,47 ± 0,13	1,45 ± 0,13	1,47 ± 0,16
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	$1{,}25 \cdot 10^5 \pm 1{,}26 \cdot 10^4$	$1{,}19 \cdot 10^5 \pm 6{,}56 \cdot 10^3$	$1{,}25 \cdot 10^5 \pm 2{,}39 \cdot 10^4$

1.1.5 Enzymkinetik: D-Phenylalanin

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte ebenfalls photometrisch als Dreifachbestimmung mit drei biologischen Replikaten. Die niedrigste D-Phenylalaninkonzentration betrug 100 µM, die größte 2000 µM.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für das Substrat D-Phenylalanin betrug bei der Michaelis-Menten-Auftragung 0,19 ± 0,04 mkat kg^{-1}. Der K_m-Wert für D-Phenylalanin konnte mit 189 ± 84 µM bestimmt werden (Abb. 19, links). Nach der Linearisierung durch eine doppelt reziproke Auftragung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung; Abb. 19, rechts) konnte ein K_m-Wert für das Substrat D-Phenylalanin von 236 ± 90 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 0,19 ± 0,04 mkat kg^{-1}.

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

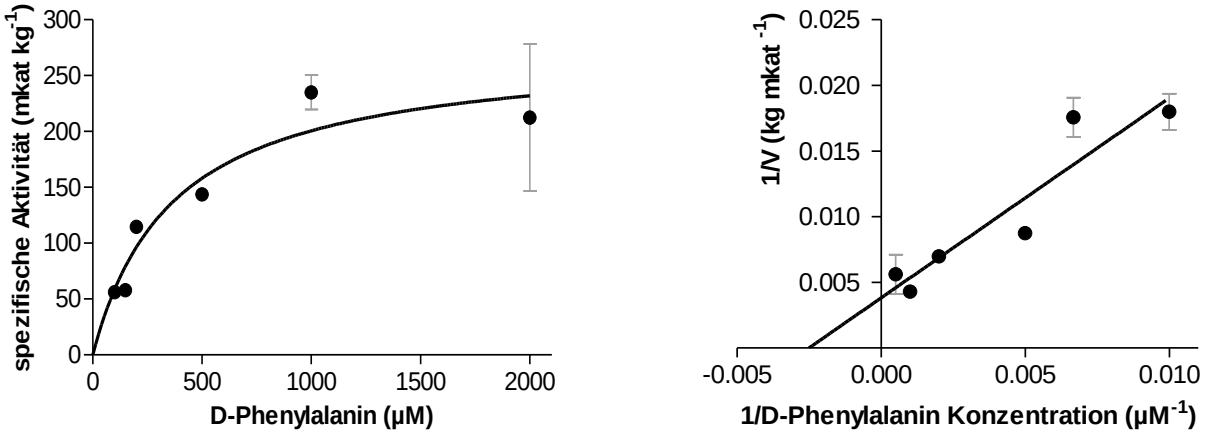


Abb. 19 PAL 1: links: Substratsättigungskurve für D-Phenylalanin zur Bestimmung des K_m-Werts (ein biologisches Replikat, n = 3 ± Standardfehler), rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n=3 ± Standardfehler).

Anhand des Hanes-Woolf-Diagramm konnte für D-Phenylalanin ein K_m-Wert von 149 ± 42 µM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 0,17 ± 0,02 mkat kg^{-1} bestimmt werden.

Zusammenfassend konnten mit der photometrischen Bestimmungsmethode und der unterschiedlichen Auswertungs- und Darstellungsmethoden die folgenden Werte für die Phenylalanin Ammoniak-Lyase Isoform 1 und das Substrat D-Phenylalanin ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk**[1]	**Hanes-Woolf**[1]
K_m (µM)	189 ± 84	236 ± 90	149 ± 42
V_{max} (mkat kg^{-1})	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,17 ± 0,02
k_{cat} (s^{-1})	$1{,}59 \cdot 10^{-2} \pm 3{,}00 \cdot 10^{-3}$	$1{,}59 \cdot 10^{-2} \pm 2{,}89 \cdot 10^{-3}$	$1{,}38 \cdot 10^{-2} \pm 1{,}74 \cdot 10^{-3}$
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	114 ± 39	84 ± 25	104 ± 21

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

1.1.6 Enzymkinetik: L-Tyrosin

Auch die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit für L-Tyrosin erfolgte photometrisch als Dreifachbestimmung mit drei biologischen Replikaten. Die niedrigste L-Tyrosinkonzentration betrug 200 µM, die größte noch messbare Konzentration 6000 µM. Höhere L-Tyrosinkonzentrationen führten im Reaktionsansatz zu einer unbekannten, nicht-reversiblen Präzipitation der Komponenten. Darüber hinaus konnte bis zur maximalen Konzentration keine Substratsättigung verzeichnet werden. Aus diesem Grund wurde für die Auswertung und Bestimmung der kinetischen Parameter die Cornish-Bowden-Methode angewendet.

Die Cornish-Bowden-Darstellung (Eisenthal und Cornish-Bowden 1974) beschreibt eine weitere Analysemethode zur Bestimmung von kinetischen Parametern. Sie findet besonders bei den Messungen ihren Einsatz, deren Enzyme mit steigender Substratkonzentration keine Substratsättigung erreichen. In diesem speziellen Fall kann die Michaelis-Menten-Darstellung und Berechnungsmethode nicht zuverlässig angewendet werden. Die Cornish-Bowden-Methode ist eine einfache graphische Darstellung. Für die Auswertung und Bestimmung der kinetischen Parameter sind keine mathematischen Formeln notwendig. Jeder ermittelte Messwert (x = Substratkonzentration mit y = spezifische Aktivität) wird zunächst in einem Michaelis-Menten-Plot dargestellt. Anschließend werden die ermittelten Messwerte nach der folgenden Regel ergänzt:

X = negative Substratkonzentration	mit	Y = 0
X = 0	mit	Y = spezifische Aktivität

Es entstehen jeweils zwei einzelne Messpunkte, durch die im Anschluss eine Gerade gelegt wird. Aufgrund ihrer Steigungen schneiden sich die Regressionsgeraden untereinander an verschiedenen Punkten. Jeder dieser Punkte bildet auf der Y-Achse einen Wert für V_{max} und auf der X-Achse einen Wert für K_m. Anschließend wird der Median aus allen einzelnen Schnittpunktwerten gebildet. Dieser ermittelte Wert bildet dann die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}).

Mit der Cornish-Bowden-Methode (Abb. 20) konnte für das Substrat L-Tyrosin eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 0,77 ± 0,06 mkat kg^{-1} ermittelt werden. Der K_m-Wert betrug 2560 ± 194 µM. Die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m betrug 25 ± 1 s^{-1} M^{-1}. Die Wechselzahl k_{cat} betrug $6{,}32 \cdot 10^{-2} \pm 4{,}85 \cdot 10^{-3}$ s^{-1}.

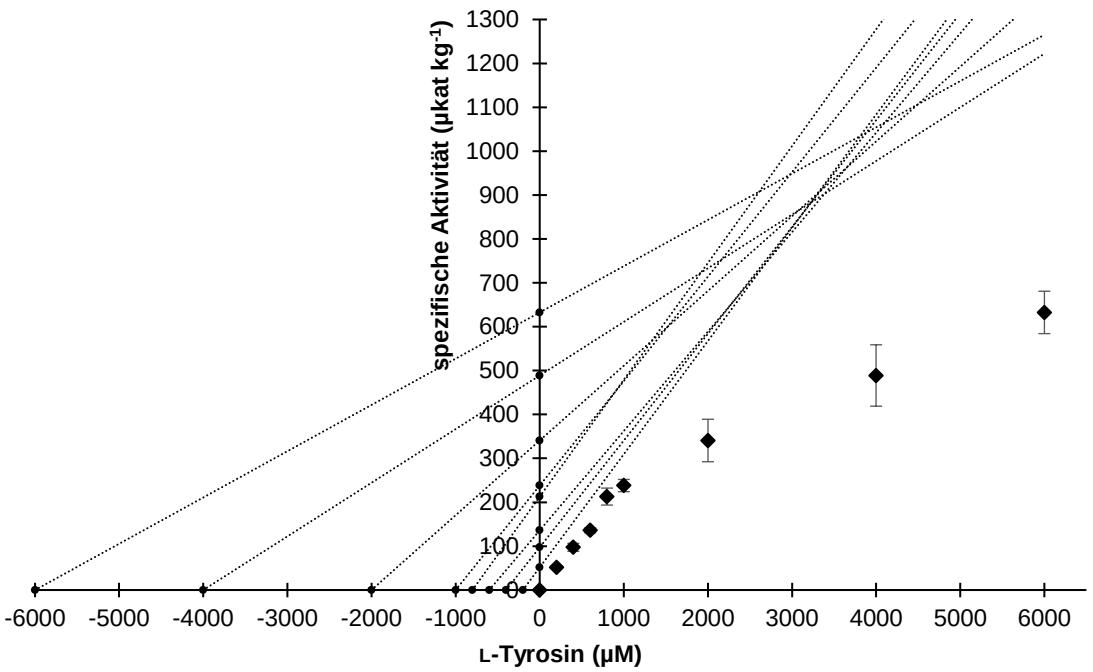


Abb. 20 PAL 1: Cornish-Bowen-Methode zur Bestimmung des K_m-Wertes (ein biologisches Replikat, n = 3 ± Standardfehler).

1.2 Phenylalanin Ammoniak-Lyase Isoform 2 (PAL 2)

Im Vergleich zur PAL 1 besitzt die PAL 2 besitzt ein geringfügig kleineres offenes Leseraster von 2133 Nukleotiden, welches für 710 Aminosäuren codiert. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 77153 Dalton und der theoretische isoelektrische Punkt liegt geringfügig höher bei pH 6,14. Analog zur PAL 1 besitzt auch die PAL 2 eine konservierte Histidin Ammoniak-Lyase Signatur (gelbe Markierung), sowie eine Ala-Ser-Gly-Tripeptidsequenz (grüne Markierung) (Wu et al. 2014). Auch die potentielle äußere Deckelschleife (rosa Markierung) und die Abschirm-Domäne (grau unterlegt) sind in der PAL 2 vorhanden (Jun et al. 2018).

```
atggcgaacaacaaccgacacgtggctaccgagttgtgcattaataaggatccattgaac
 M  A  N  N  N  R  H  V  A  T  E  L  C  I  N  K  D  P  L  N
tggggtttggcagcggaggcgatgacggggagtcaccttgatgaggtgaagagaatggtg
 W  G  L  A  A  E  A  M  T  G  S  H  L  D  E  V  K  R  M  V
gcggagttcaggaagccggtggtgaagctgggaggagagactctgacggtttctcaggtg
 A  E  F  R  K  P  V  V  K  L  G  G  E  T  L  T  V  S  Q  V
gccggaattgcggctgccggtgagagttccgttgtgacggtggagctgtcggaggcggcg
 A  G  I  A  A  A  G  E  S  S  V  V  T  V  E  L  S  E  A  A
agggctggggtgaaggcaagtagtgattgggtgatggagagcatgaacaaaggaactggt
 R  A  G  V  K  A  S  S  D  W  V  M  E  S  M  N  K  G  T  G
agttacggtgtcaccaccggattcggagccacctctcaccggcggaccaagcaaggtggg
 S  Y  G  V  T  T  G  F  G  A  T  S  H  R  R  T  K  Q  G  G
gcacttcagaaggagctcattagatttttaaacgctggaatctttggcaacggcacagaa
 A  L  Q  K  E  L  I  R  F  L  N  A  G  I  F  G  N  G  T  E
```

```
tcatcccacacccttccacattcagcaacaagagccgccatgctggtaagaatcaacact
 S  S  H  T  L  P  H  S  A  T  R  A  A  M  L  V  R  I  N  T
ctccttcagggttactccggtatccgtttcgagatcttggaagccatcaccaagttcctc
 L  L  Q  G  Y  S  G  I  R  F  E  I  L  E  A  I  T  K  F  L
aataccaacgtcaccccttgtttgccgctccgtggcaccatcaccgcctccggcgacctt
 N  T  N  V  T  P  C  L  P  L  R  G  T  I  T  A  S  G  D  L
gttccgttgtcctacattgccagacttctcaccggtcgtcccaactccaaagccgttggt
 V  P  L  S  Y  I  A  R  L  L  T  G  R  P  N  S  K  A  V  G
cccaccggagaaatcctcaatgccgaacaggccttcaccctcgctggagtctccggtggc
 P  T  G  E  I  L  N  A  E  Q  A  F  T  L  A  G  V  S  G  G
ttcttcgagctacagccaaaagaaggtctagcacttgtgaacggtacagccgtcggatcc
 F  F  E  L  Q  P  K  E  G  L  A  L  V  N  G  T  A  V  G  S
ggcatggcctccatggtccttttgaagccaatgtgcttgcattgttatcggaagttatg
 G  M  A  S  M  V  L  F  E  A  N  V  L  A  L  L  S  E  V  M
tccgccattttcgctgaagttatgcaagggaaaccggagtttaccgaccacttgacacat
 S  A  I  F  A  E  V  M  Q  G  K  P  E  F  T  D  H  L  T  H
aaattgaagcatcaccctggccaaatcgaggctgctgcgataatggaatacattttagac
 K  L  K  H  H  P  G  Q  I  E  A  A  A  I  M  E  Y  I  L  D
ggaggtgattacgttaaggccgcccaaaagctccacgaaatggaccctttgcagaaacct
 G  G  D  Y  V  K  A  A  Q  K  L  H  E  M  D  P  L  Q  K  P
aaacaagatcgttacgctctacggacctcaccccaatggctcggaccacacnntgaggtc
 K  Q  D  R  Y  A  L  R  T  S  P  Q  W  L  G  P  H  X  E  V
atccgatcgtcaactaaaatgatcgaaagagagattaattccgttaacgacaaccctttg
 I  R  S  S  T  K  M  I  E  R  E  I  N  S  V  N  D  N  P  L
atcgacgttgcaagaaacaaggcgttacacggaggaaacttccaaggaactccgattgga
 I  D  V  A  R  N  K  A  L  H  G  G  N  F  Q  G  T  P  I  G
gtttccatggacaacacacgtttagcaatcgcatccatcggaaaacttatgtttgctcaa
 V  S  M  D  N  T  R  L  A  I  A  S  I  G  K  L  M  F  A  Q
ttctccgagctcgtaaacgacttctacaacaacggattaccttcaaatctttccggtgga
 F  S  E  L  V  N  D  F  Y  N  N  G  L  P  S  N  L  S  G  G
cggaaccctagtttggattacggattcaaaggagcagaaatcgcaatggcttcttactgt
 R  N  P  S  L  D  Y  G  F  K  G  A  E  I  A  M  A  S  Y  C
tcggaactccagtttcttgcaaatccggtaactaaccatgttcaaagtgccgaacaacac
 S  E  L  Q  F  L  A  N  P  V  T  N  H  V  Q  S  A  E  Q  H
aaccaagacgtaaactctttgggtttgatttccgcaagaaaaacatccgaagctgtcgaa
 N  Q  D  V  N  S  L  G  L  I  S  A  R  K  T  S  E  A  V  E
atcttgaagcttatgtcaactacatacttagtggctctatgccaatccatcgacttaagg
 I  L  K  L  M  S  T  T  Y  L  V  A  L  C  Q  S  I  D  L  R
catttggaagagaacatgagatccacagtaaagaacacggttagccaagtagcaaaaaag
 H  L  E  E  N  M  R  S  T  V  K  N  T  V  S  Q  V  A  K  K
gtcctaaccatgggagttaatggtgagctccacccatctaggttctgcgaaaaggactta
 V  L  T  M  G  V  N  G  E  L  H  P  S  R  F  C  E  K  D  L
cttcgagtagttgaccgagagtacgtctttgcatacatcgatgacccttgcagtgccact
 L  R  V  V  D  R  E  Y  V  F  A  Y  I  D  D  P  C  S  A  T
tatccattgatgcagaagcttcgacaagttctggtcgaccacgccttaaacaatggtgaa
 Y  P  L  M  Q  K  L  R  Q  V  L  V  D  H  A  L  N  N  G  E
accgagaagaatacgagcacttcaatcttccaaaagattggtgcttttgaagacgaattg
 T  E  K  N  T  S  T  S  I  F  Q  K  I  G  A  F  E  D  E  L
aaagccatcttgccgaaagaagttgaaggtgttagaagttcatatgaagatggttcattg
 K  A  I  L  P  K  E  V  E  G  V  R  S  S  Y  E  D  G  S  L
gcaattccaaacaggatcaaagcttgcagatcatacccattatacaggtttgttagggaa
 A  I  P  N  R  I  K  A  C  R  S  Y  P  L  Y  R  F  V  R  E
gaacttggaactggatttttgacaggtgagaaggtgacgtcaccaggggaggagtttgat
 E  L  G  T  G  F  L  T  G  E  K  V  T  S  P  G  E  E  F  D
aaggtgtttacagcaatgtgcaaaggccaaatcattgatccattgctggaatgtgttgag
 K  V  F  T  A  M  C  K  G  Q  I  I  D  P  L  L  E  C  V  E
ggttggaatggtgcacctcttccaatatgttag
 G  W  N  G  A  P  L  P  I  C  -
```

Die NCBI Datenbank Analyse durch das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) zeigte Ähnlichkeiten mit anderen PAL-Sequenzen aus unterschiedlichen Pflanzenarten, alles

Vertreter der Familie Asteraceae. Die fünf höchsten Ähnlichkeiten zeigt die nachfolgende Tabelle 3 (Stand Februar 2021).

Tabelle 3 NCBI Datenbank Analyse für die PAL 2 sortiert nach absteigender Identität/Übereinstimmung.

Nr.	Organismus	Identität	Sequenzlänge (bp)	EMBL Sequenz ID
1	*Cynara cardunculus* var. *scolymus*	92 %	2353	XM_025117164.1
2	*Saussurea involucrata*	88 %	2420	KR811212.1
3	*Lactuca sativa*	88 %	2470	XM_023912046.1
4	*Helianthus annuus*	84 %	2440	XM_022150314.2
5	*Cichorium intybus*	84 %	2341	KP752086.1

1.2.1 Expression der PAL 2 in *Escherichia coli*

Da auch die Expression des PAL 2 Gens im Vektor pET15b geplant war, wurden an dem 5`-Ende der Sequenz eine NdeI- und am 3`-Ende eine XhoI Schnittstelle angefügt. Jedoch war die Ligation der Sequenz in den Expressionsvektor nicht erfolgreich. Da sich herausstellte, dass die Expression der PAL 1 im pET15b Vektor nicht erfolgreich war, wurden die Ligationsversuche der PAL 2 in pET15b hier abgebrochen.

Nachfolgend wurde die Restriktionsschnittstelle am 3`-Ende der PAL 2 Sequenz für eine Klonierung in den pRSET C Vektor angepasst. Die neue Restriktionsschnittstelle wurde auf das Enzym EcoRI modifiziert. Die darauffolgende Ligation in den neuen Vektor, sowie die Transformation und Expression in den SoluBL21 Zellen waren erfolgreich.

Aufgrund der sechs hintereinander liegenden Histidinreste am *N*-terminalen Anfang des heterolog exprimierten Proteins ließ sich auch die PAL 2 nachfolgend durch die Chromatographie über eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni-NTA) isolieren und aufreinigen. Abb. 21 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel mit den einzelnen Aufreinigungsfraktionen. Hierbei konnten pro Expression Proteinmengen von bis zu 70 mg pro 100 ml Bakterienkultur erzielt werden.

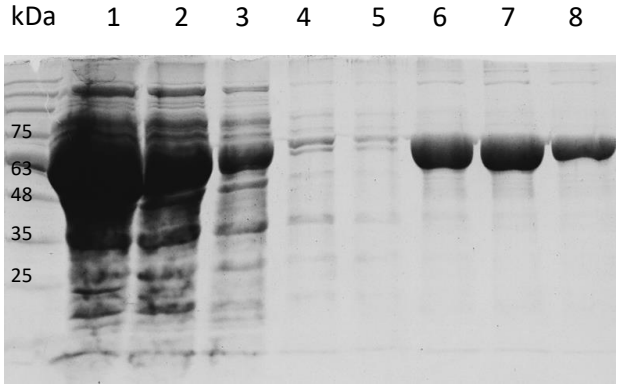


Abb. 21 PAL 2: SDS-PAGE der Fraktionen einer Aufreinigung der mit *N*-terminalem 6x-His-tag versehenen PAL 2 über Metallchelatchromatographie, 1. Rohextrakt, 2. Durchfluss, 3. Waschen I, 4. Waschen II, 5. Waschen III; 6. Elution I, 7. Elution II, 8. Elution III

1.2.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes

Für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurden drei unterschiedliche Puffersysteme getestet. Die höchste spezifische Enzymaktivität von 29 mkat kg^{-1} wurde im Borsäure-Borax-Puffer bei pH 8,2 ermittelt (Abb. 22). Im Tris/HCl-Puffer liegt das pH-Optimum bei pH 8,4 mit einer spezifischen Aktivität von 27 mkat kg^{-1}. Die höchste enzymatische Aktivität liegt beim CAPS-Puffer bei pH 9,6.

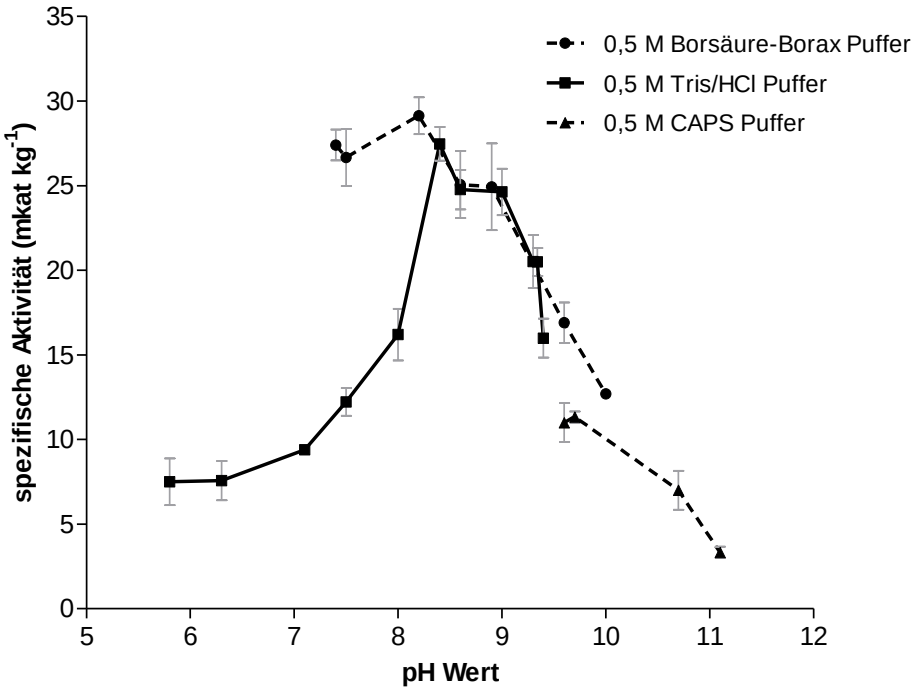


Abb. 22 PAL 2: Bestimmung des optimalen Puffers und pH-Werts für PAL Isoform 2 (n = 3 ± Standardfehler).

1.2.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurde bei der Isoform 2 ein 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,5 Puffer verwendet. Die nachfolgende Abb. 23 zeigt eine hohe spezifische Aktivität von 87 mkat kg^{-1} am Temperaturoptimum von 60°C.

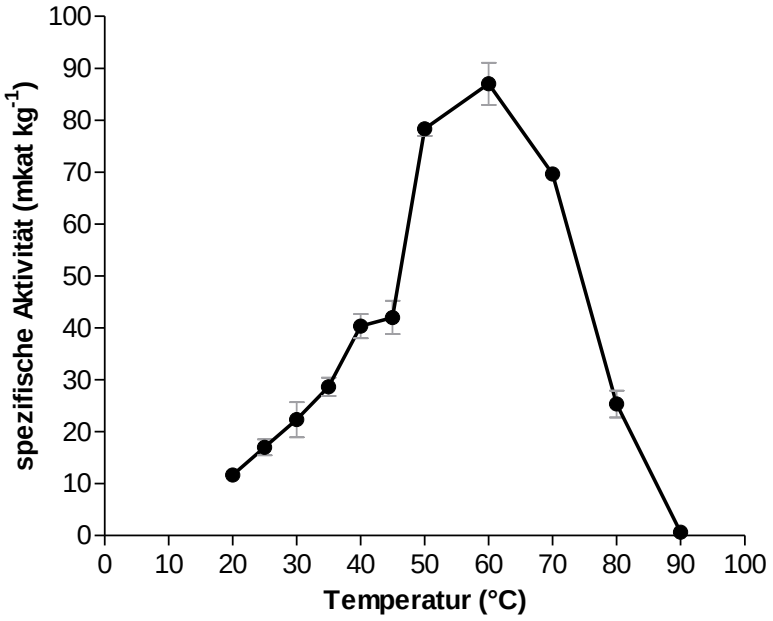


Abb. 23 PAL 2: Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur der PAL Isoform 2 (n = 3 ± Standardfehler).

1.2.4 Enzymkinetik: L-Phenylalanin

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte photometrisch als Dreifachbestimmung mit drei biologischen Replikaten. Die niedrigste L-Phenylalaninkonzentration im Reaktionsansatz betrug 5 µM und die größte 2000 µM. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für L-Phenylalanin bei der Michaelis-Menten-Auftragung betrug 16,1 ± 1,8 mkat kg^{-1}. Der K_m-Wert für das Substrat L-Phenylalanin konnte mit 27,7 ± 5,8 µM bestimmt werden (Abb. 24, links).

Nach der Linearisierung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung Abb. 24, rechts) konnte eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 16,7 ± 1,7 mkat kg^{-1} errechnet werden. Der K_m-Wert für das Substrat L-Phenylalanin betrug 33,7 ± 5,2 µM.

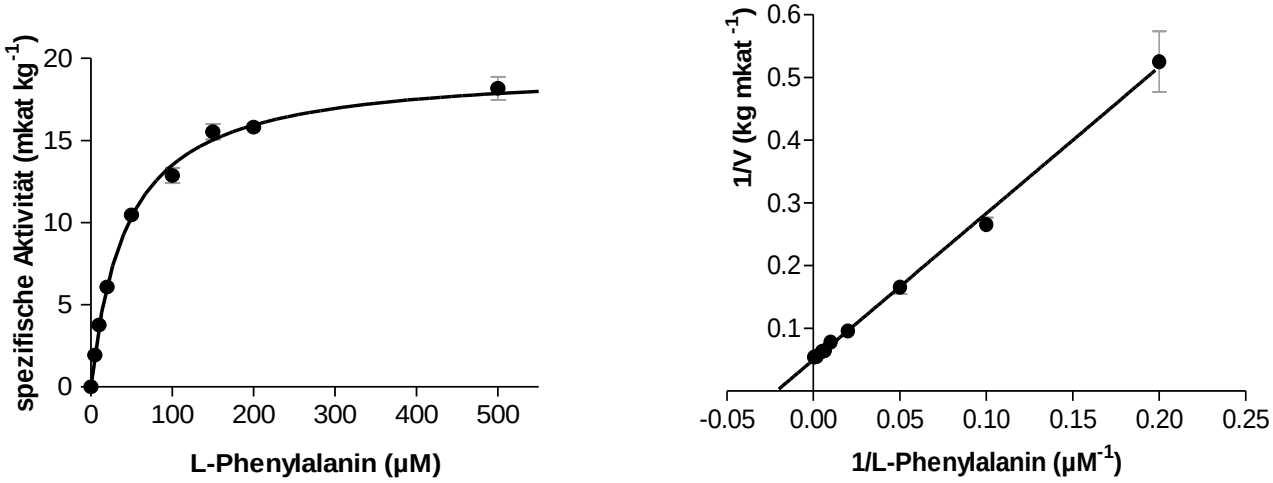


Abb. 24 PAL 2: links: Substratsättigungskurve für L-Phenylalanin zur Bestimmung des K_m-Werts (Der Messwert bei 2 mM wurde aus der graphischen Darstellung herausgenommen.), rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Anhand des Hanes-Woolf-Linearisierungsverfahrens konnte für L-Phenylalanin ein K_m-Wert von 35,2 ± 4,2 µM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 17,3 ± 1,7 mkat kg^{-1} bestimmt werden.

Für das L-Phenylalanin konnten zusammenfassend die folgenden Werte ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk**[1]	**Hanes-Woolf**[1]
K_m (µM)	27,7 ± 5,8	33,8 ± 5,2	35,2 ± 4,2
V_{max} (mkat kg^{-1})	16,1 ± 1,8	16,7 ± 1,7	17,3 ± 1,7
k_{cat} (s^{-1})	1,31 ± 0,17	1,36 ± 0,16	1,41 ± 0,16
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	$5{,}04 \cdot 10^4 \pm 5{,}65 \cdot 10^3$	$3{,}25 \cdot 10^4 \pm 1{,}30 \cdot 10^3$	$4{,}05 \cdot 10^4 \pm 1{,}74 \cdot 10^3$

1.2.5 Enzymkinetik: D-Phenylalanin

Auch die Bestimmung von K_m und V_{max} für das D-Phenylalanin erfolgte photometrisch als Dreifachbestimmung mit drei biologischen Replikaten. Die kleinste Substratkonzentration betrug 100 µM, die größte 2000 µM.

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für D-Phenylalanin bei der Michaelis-Menten-Auftragung (Abb. 25, links) betrug 0,21 ± 0,01 mkat kg^{-1}. Der K_m-Wert für D-Phenylalanin wurde mit 177 ± 47 µM errechnet.

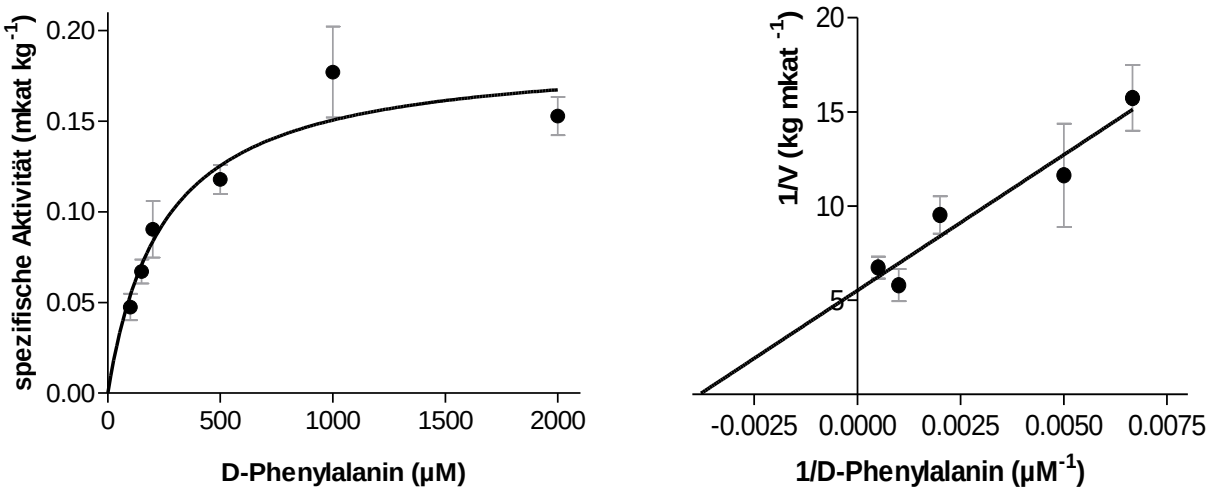


Abb. 25 PAL 2: links: Substratsättigungskurve für D-Phenylalanin zur Bestimmung des K_m-Werts. rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Durch eine doppelt reziproke Auftragung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung, Abb. 25, rechts) konnte für D-Phenylalanin ein K_m-Wert von 146 ± 1,8 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 0,20 ± 0,01 mkat kg^{-1}. Durch das Hanes-Woolf-Diagramm konnte für D-Phenylalanin ein K_m-Wert von 153 ± 41 µM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 0,19 ± 0,01 mkat kg^{-1} bestimmt werden.

Zusammenfassend konnten anhand der unterschiedlichen Auswertungs- und Darstellungsmethoden die folgenden Werte für das D-Phenylalanin ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk**[1]	**Hanes-Woolf**[1]
K_m (µM)	177 ± 47	146 ± 1,8	153 ± 41
V_{max} (mkat kg^{-1})	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,01
k_{cat} (s^{-1})	$1{,}75 \cdot 10^{-2} \pm 1{,}02 \cdot 10^{-3}$	$1{,}65 \cdot 10^{-2} \pm 1{,}01 \cdot 10^{-3}$	$1{,}55 \cdot 10^{-2} \pm 1{,}04 \cdot 10^{-3}$
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	116 ± 33	113 ± 5	121 ± 38

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

1.2.6 Enzymkinetik: L-Tyrosin

Über die Cornish-Bowden-Methode (Abb. 26) konnte für die PAL 2 und das Substrat L-Tyrosin eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 0,25 ± 0,06 mkat kg^{-1} errechnet werden. Der K_m-Wert beträgt 2375 ± 841 µM. Die Wechselzahl k_{cat} betrug $2{,}09 \cdot 10^{-2} \pm 9{,}28 \cdot 10^{-3}$ s^{-1}. Die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m betrug 8,59 ± 0,91 s^{-1} M^{-1}.

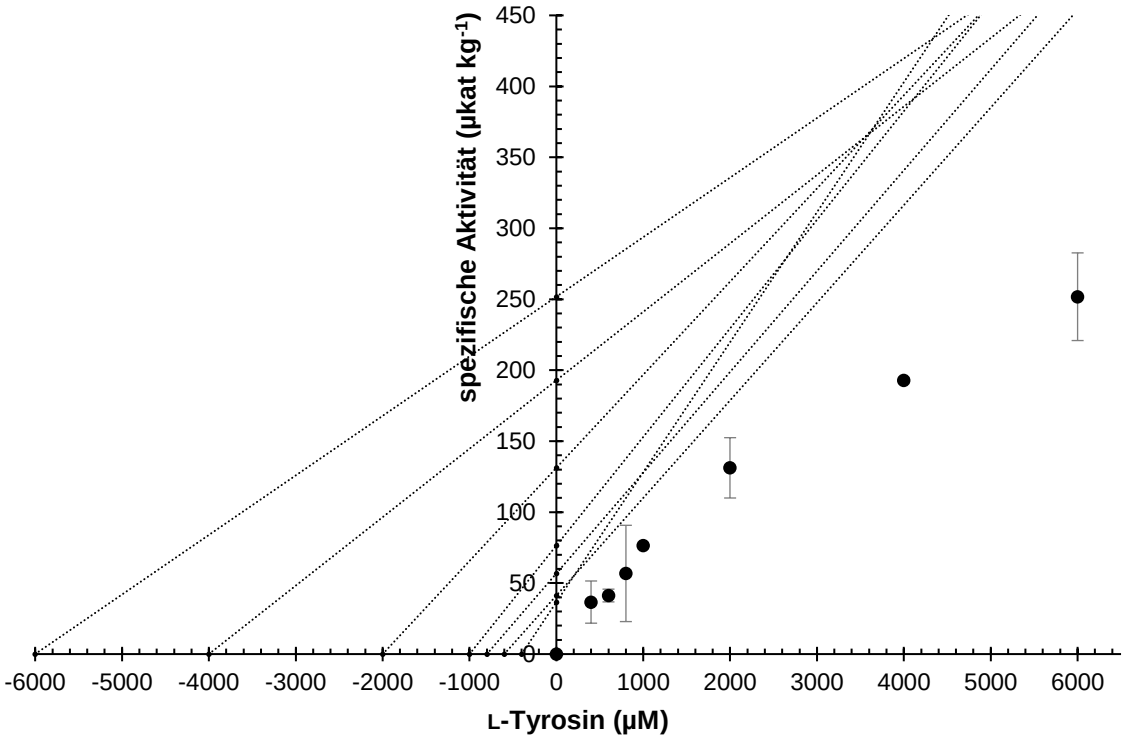


Abb. 26 PAL 2: Cornish-Bowden-Methode zur Bestimmung des K_m-Werts (ein biologisches Replikat (n = 3 ± Standardfehler)

2. Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD)

Mit Hilfe der NCBI Datenbank konnte bereits eine partiell vorliegende CAD Sequenz (414 Nukleotide lang) von *S. marianum* (KP861884.1) ausfindig gemacht werden. Nach der Synthese eines spezifischen, vorwärts gerichteten Primers konnte durch die sogenannte 3´-RACE Polymerasekettenreaktion der fehlende hintere Sequenzabschnitt erfolgreich amplifiziert und als zugehörige CAD identifiziert werden. Durch die 5‘-RACE PCR konnte im Anschluss die vollständige *N*-terminale Nucleotidsequenz verifiziert werden. Die folgende Abb. 27 zeigt die amplifizierte CAD Volllänge.

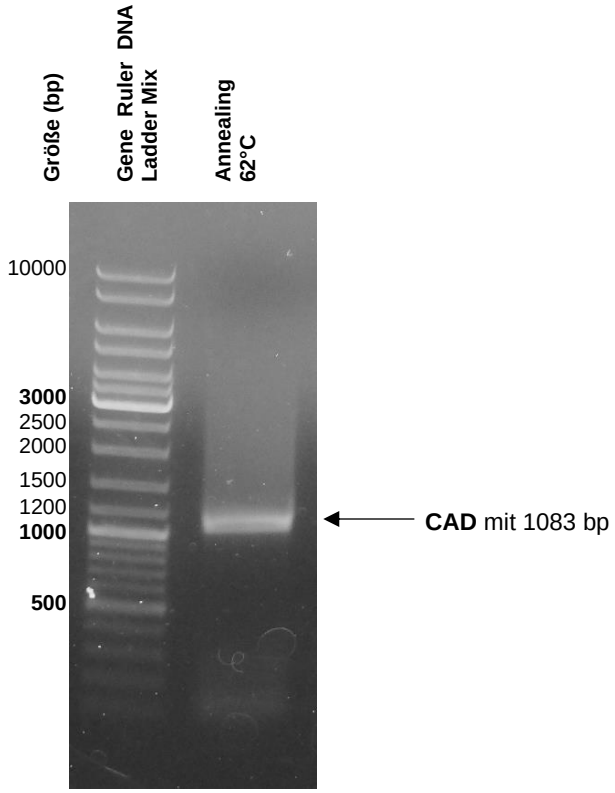


Abb. 27 Amplifikation der Volllängensequenz der Coniferylalkohol Dehydrogenase

Die Coniferylalkohol Dehydrogenase besitzt in ihrer Gesamtlänge ein offenes Leseraster von 1083 Nukleotiden, welches codierend ist für 342 Aminosäuren. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 38855 Dalton und der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,56. Das Protein besitzt zwei Zink-Ionen Bindedomänen (hellblau und grüne Markierung) und eine besonders stark konservierte $NADPH_2$-Bindedomäne (gelbe Markierung) (Chao et al. 2014).

```
atggcgaaatctccagagacggaacatccaatcaaggcctatggatatgctgctcgagac
 M  A  K  S  P  E  T  E  H  P  I  K  A  Y  G  Y  A  A  R  D
acttccggaatactttctcctctcaccttctcccgaagggctactggtgataaggacgtg
 T  S  G  I  L  S  P  L  T  F  S  R  R  A  T  G  D  K  D  V
```

```
aggtttaaaatcttgtattgcgggatctgccattccgatcttcactttgtcaaaaacgaa
 R  F  K  I  L  Y  C  G  I  C  H  S  D  L  H  F  V  K  N  E
tggggcatgactgtttatcccgttgttcctgggcatgaaattgttggtatggtgacggaa
 W  G  M  T  V  Y  P  V  V  P  G  H  E  I  V  G  M  V  T  E
gtcggcagcaaagtagagaaattcaaaatcggggacaaagttggcgttggatgcttggtg
 V  G  S  K  V  E  K  F  K  I  G  D  K  V  G  V  G  C  L  V
ggatcatgccgttcctgcgaaagttgcactaatgatcttgaaaactactgcccaaaacag
 G  S  C  R  S  C  E  S  C  T  N  D  L  E  N  Y  C  P  K  Q
attctcacttatggtctcccctactttgatggcacacgcacatacggtgggtactcggac
 I  L  T  Y  G  L  P  Y  F  D  G  T  R  T  Y  G  G  Y  S  D
cacatggttgcagatgagcattttgttctccgttggccagagaatttgccgcttgatact
 H  M  V  A  D  E  H  F  V  L  R  W  P  E  N  L  P  L  D  T
ggtgcaccgctgctctgtgctgggatcacaacttacagccccctcagatactttggacta
 G  A  P  L  L  C  A  G  I  T  T  Y  S  P  L  R  Y  F  G  L
gataaacctggtgtgaaagtgggcgtggttggtcttggtggtctaggccatgttgctgtc
 D  K  P  G  V  K  V  G  V  V  G  L  G  G  L  G  H  V  A  V
aagatggctaaggcttttggtgcagaagttacagtcttcagtactacggctaacaagaaa
 K  M  A  K  A  F  G  A  E  V  T  V  F  S  T  T  A  N  K  K
caagaagcacttgaaggacttaaagctgaccgtttcatagtcagccaagacccagagcaa
 Q  E  A  L  E  G  L  K  A  D  R  F  I  V  S  Q  D  P  E  Q
atgcagtctgcagctagttcgttggatggaataattgacacagtgtctgcaactcacccg
 M  Q  S  A  A  S  S  L  D  G  I  I  D  T  V  S  A  T  H  P
attgcaccgttgcttagtgtgcttaaaccacacgggaagcttgtgcttgttggtgcaccg
 I  A  P  L  L  S  V  L  K  P  H  G  K  L  V  L  V  G  A  P
gagaagccacttgagctatctgcgttttctttaatcatggggaggaaaattgttgctgga
 E  K  P  L  E  L  S  A  F  S  L  I  M  G  R  K  I  V  A  G
agtgcaattggagggttgaaagagactcaagaaatgctggattttgcagcaaagcatggt
 S  A  I  G  G  L  K  E  T  Q  E  M  L  D  F  A  A  K  H  G
gtgactgcggatatagaggttattccgatagactatgtgaacactgccatggatcgtatc
 V  T  A  D  I  E  V  I  P  I  D  Y  V  N  T  A  M  D  R  I
ttgaaatccgatgttagatatcggtttgtgattgatgtcgccaattccctcaaagctccg
 L  K  S  D  V  R  Y  R  F  V  I  D  V  A  N  S  L  K  A  P
taa
 -
```

Eine erneute Datenbank Analyse durch das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zeigte Ähnlichkeiten mit weiteren CAD Sequenzen aus unterschiedlichen Pflanzenarten. Die fünf höchsten Ähnlichkeiten zeigt die nachfolgende Tabelle 4 (Stand Februar 2021). Die genannten ähnlichsten Sequenzen stammen von Arten aus der Familie Asteraceae.

Tabelle 4 NCBI Datenbank Analyse für die CAD sortiert nach absteigender Identität/Übereinstimmung

Nr.	Organismus	Identität	Sequenzlänge (bp)	EMBL Sequenz ID
1	*Cynara cardunculus var. scolymus*	93 %	1252	XM_025116069.1
2	*Carthamus tinctorius*	92 %	1297	AB576774.1
3	*Lactuca sativa*	85 %	1278	XM_023879803.1
4	*Helianthus annuus*	83 %	1334	XM_022154290.1
5	*Tanacetum cinerariifolium*	78 %	1092	MK139706.1

2.1 Expression der CAD in Escherichia coli

Da eine Expression des CAD Gens im Vektor pET15b geplant war, wurden am 5`-Ende der Sequenz eine NdeI- und am 3`-Ende eine BamHI Schnittstelle eingefügt. Nachdem die CAD Volllänge erfolgreich amplifiziert werden konnte, wurde die Sequenz mit Hilfe des pDRIVE Vektors vervielfältigt. Nach der Isolierung des pDRIVE Vektors aus den *E. coli* Zellen wurde das Zielgen an den entsprechenden Restriktionsschnittstellen herausgeschnitten. Leider war trotz mehrmaliger Versuche eine Ligation der CAD Sequenz in den Expressionsvektor pET15b nicht erfolgreich.

Daraufhin wurde erneut eine PCR mit frisch isolierter mRNA (cDNA) aus einem Sämling (Pflanzenwachstum bis ca. 10 cm) durchgeführt. Unmittelbar nach der PCR wurde das Produkt über die Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und im Anschluss mit den Restriktionsenzymen BamHI und NdeI passend auf den pET15b zugeschnitten. Mithilfe der T4 DNA-Ligase konnte das Zielgen in den Vektor ligiert und anschließend direkt in die SoluBL21 Zellen eingebracht werden.

Nach erfolgreicher Transformation konnte eine rekombinante Proteinproduktion durchgeführt werden. Eine anschließende Anti-His-Tag Aufreinigung über eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni-NTA) Chromatographie war ebenfalls erfolgreich (Abb. 28).

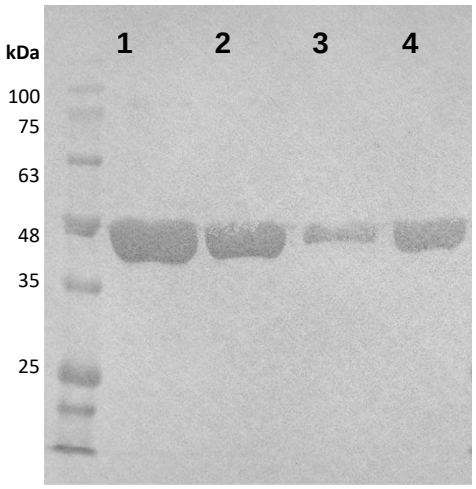


Abb. 28 CAD: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen einer CAD mit *N*-terminalem 6x-His-tag aus der Metallchelatchromatographie 1. Elution I, 2. Elution II, 3. Elution III, 4. über PD10-Säule umgepuffertes Enzym

2.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes

Für die Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes wurden vier verschiedene Puffersysteme getestet. Die höchste spezifische Enzymaktivität von 1012 mkat kg^{-1} wurde im CHES-Puffer bei pH 9,1 ermittelt (Abb. 29). Im CAPS-Puffer wurde die höchste Enzymaktivität

bei pH 9,6 mit 988 mkat kg^{-1} nachgewiesen. Im Tris/HCl-Puffer liegt das Optimum bei pH 8,8 mit einer spezifischen Aktivität von 348 mkat kg^{-1} und im Kaliumphosphat Puffer bei pH 8,5 mit einem Wert von 279 mkat kg^{-1}.

Durch die Zugabe des Substrates Coniferylalkohol wurde beim CHES- und Kaliumphosphat-Puffer eine Gelbfärbung des Reaktionsansatzes beobachtet. Diese Verfärbung erschwerte die photometrische Messung und nahm mit steigendem pH-Wert an Intensität zu. Trotz der deutlich geringeren spezifischen Enzymaktivität wurden zur Vermeidung von Messungenauigkeiten alle weiteren biochemischen Charakterisierungen in einem 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 8,8 durchgeführt (vgl. Burkh et al. 2012, O´Malley et al. 1992).

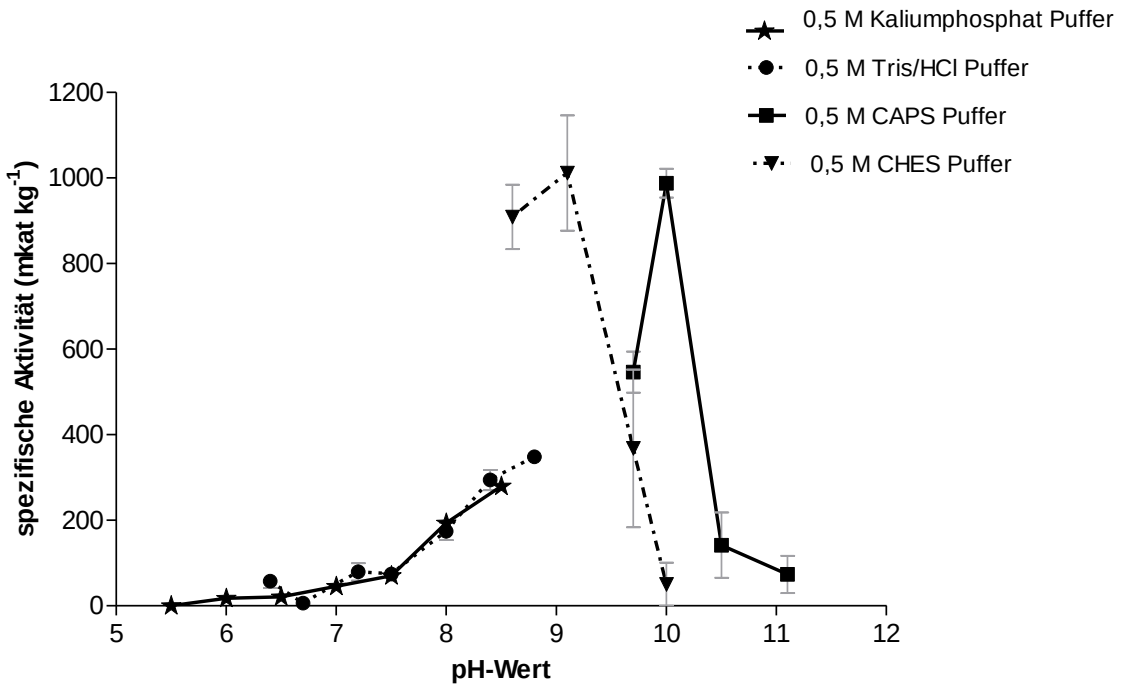


Abb. 29 CAD: Bestimmung des optimalen pH-Wertes in verschiedenen Puffersystemen (n = 3 ± Standardabweichung).

2.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurde bei der CAD ein 0,1 M Tris/HCl pH 8,8 Puffer verwendet. Die nachfolgende Abb. 30 zeigt eine hohe spezifische Aktivität von 637 mkat kg^{-1} am Temperaturoptimum von 55 °C.

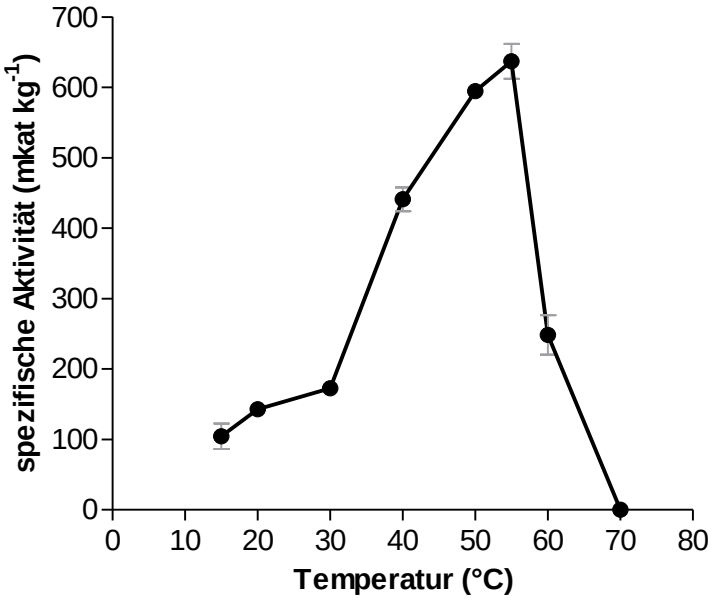


Abb. 30 CAD: Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur CAD (n = 3 ± Standardfehler).

2.4 Enzymkinetik: Coniferylalkohol

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte photometrisch als Dreifachbestimmung mit drei biologischen Replikaten. Der K_m-Wert für das Substrat Coniferylalkohol konnte bei der Michaelis-Menten-Auftragung (Abb. 31, links) mit 25,0 ± 5,1 µM bestimmt werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für das Substrat Coniferylalkohol konnte mit 746 ± 149 mkat kg^{-1} bestimmt werden.

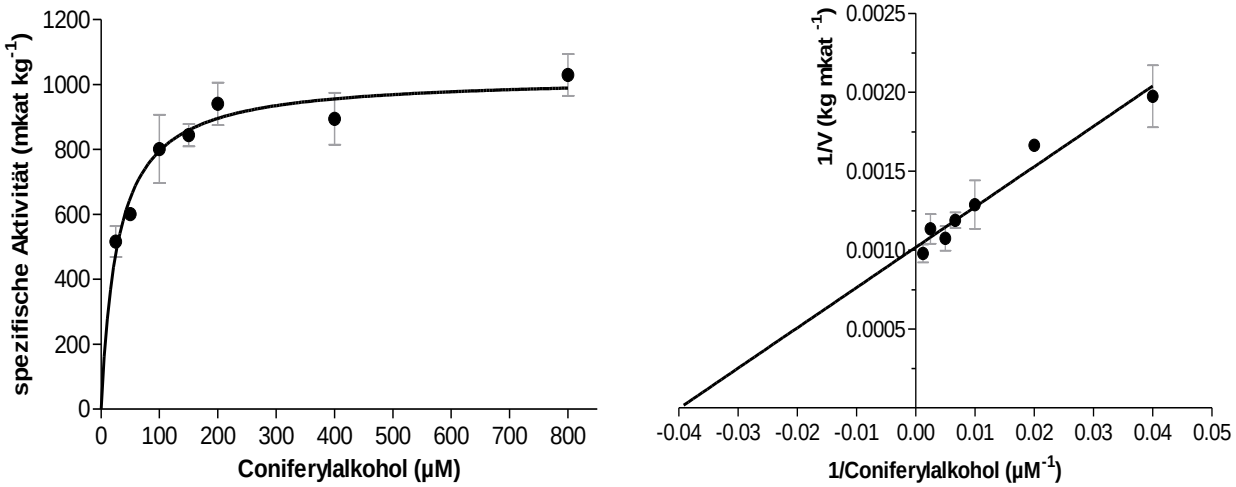


Abb. 31 CAD: links: Substratsättigungskurve für Coniferylalkohol zur Bestimmung des K_m-Werts (ein biologisches Replikat, n = 3 ± Standardfehler). rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Nach der Linearisierung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung (Abb. 31, rechts) konnte für Coniferylalkohol ein K_m-Wert von 19,3 ± 3,4 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit konnte auf einen Wert von 706 ± 147 mkat kg^{-1} festgelegt werden. Durch Hanes-Woolf-Methode konnte ein K_m-Wert von 29,2 ± 6,9 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 742 ± 181 mkat kg^{-1}.

Zusammenfassend konnten anhand der unterschiedlichen Auswertungs- und Darstellungsmethoden für die Coniferylalkohol Dehydrogenase und das Substrat Coniferylalkohol die folgenden Werte ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk[1]**	**Hanes-Woolf[1]**
K_m (µM)	25,0 ± 5,1	19,3 ± 3,4	29,2 ± 6,9
V_{max} (mkat kg^{-1})	746 ± 149	706 ± 147	742 ± 181
k_{cat} (s^{-1})	30,6 ± 6,1	29,0 ± 6,0	30,5 ± 7,4
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	$1{,}36 \cdot 10^6 \pm 3{,}65 \cdot 10^5$	$1{,}55 \cdot 10^6 \pm 2{,}93 \cdot 10^5$	$1{,}04 \cdot 10^6 \pm 7{,}09 \cdot 10^4$

2.5 Enzymkinetik: $NADP^+$

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante wurde die Konzentration des Substrats Coniferylalkohol im Ansatz auf 400 µM festgelegt. Es wurden $NADP^+$ Konzentrationen von 10 µM bis 50 µM gewählt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung bei drei biologischen Replikaten.
Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für das $NADP^+$ bei der Michaelis-Menten-Auftragung (Abb. 32, links) betrug 279 ± 23 mkat kg^{-1} und der K_m-Wert konnte auf 3,2 ± 0,3 µM bestimmt werden.

Durch eine Linearisierung und doppelt reziproken Darstellung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung, Abb. 32, rechts) konnte für das $NADP^+$ ein K_m-Wert von 3,7 ± 1,0 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 274 ± 24 mkat kg^{-1}.

[1]Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

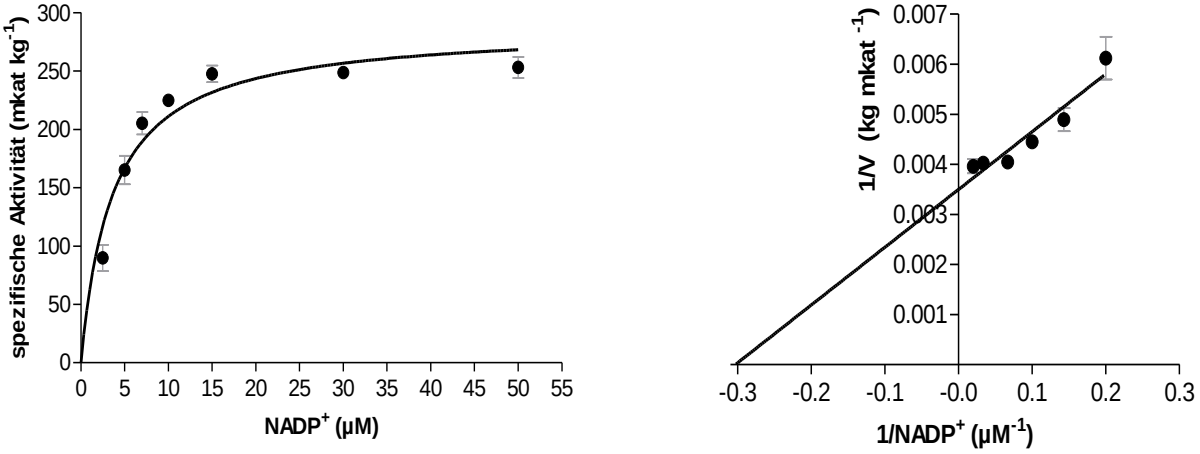


Abb. 32 CAD: CAD: links: Substratsättigungskurve für $NADP^+$ zur Bestimmung des K_m-Werts (ein biologisches Replikat, n = 3 ± Standardfehler); rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Durch das Linearisierungsverfahren von Hanes-Woolf konnte für den Cofaktor $NADP^+$ ein K_m-Wert von 3,1 ± 0,7 µM bestimmt werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 274 ± 10 mkat kg^{-1}.

Zusammenfassend konnten für den Cofaktor $NADP^+$ die folgenden Werte ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk**[1]	**Hanes-Woolf**[1]
K_m (µM)	3,2 ± 0,3	3,7 ± 1,0	3,1 ± 0,7
V_{max} (mkat kg^{-1})	279 ± 23	274 ± 24	274 ± 10
k_{cat} (s^{-1})	11,4 ± 0,9	11,3 ± 1,0	11,2 ± 0,4
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	$3{,}70 \cdot 10^6 \pm 5{,}95 \cdot 10^5$	$3{,}41 \cdot 10^6 \pm 6{,}24 \cdot 10^5$	$4{,}23 \cdot 10^6 \pm 1{,}22 \cdot 10^6$

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

3. Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR)

Mit Hilfe der 3´-RACE Polymerasekettenreaktion und spezifischen Primern aus einer konservierten Region bereits bekannter CCR Sequenzen, konnte zunächst nur ein Teilsequenzabschnitt amplifiziert werden. Diese Nukleotidsequenz ist codierend für 248 Aminosäuren der Cinnamoyl-CoA Reduktase aus *Silybum marianum*. Leider konnten durch die 5´-RACE PCR die fehlenden *N*-terminalen Sequenzbereiche nicht amplifiziert und charakterisiert werden. Eine NCBI Datenbank Analyse der bereits vorhandenen *S. marianum* CCR Sequenz durch das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ergab einige Treffer mit verschiedenen CCR Sequenzen artverwandter Pflanzen. Leider besitzen diese eine sehr hohe Sequenzvariabilität innerhalb des *N*-terminalen Bereiches.

Durch eine erneute BLAST Suche mit dem bekannten CCR Teilsequenzabschnitt in der ONEKP Plants Datenbank der China National Genebank Database (CNGBdb) konnten schließlich die fehlenden CCR Sequenzabschnitte von *S. marianum* identifiziert werden. Neue genspezifische Volllängenprimer wurden erstellt und für eine Expression im pET15b Vektor am 5`-Ende mit einer NdeI- und am 3`-Ende mit einer XhoI Schnittstelle ausgestattet. Die nachfolgende Abb. 33 zeigt die amplifizierte Volllänge der Cinnamoyl-CoA Reduktase.

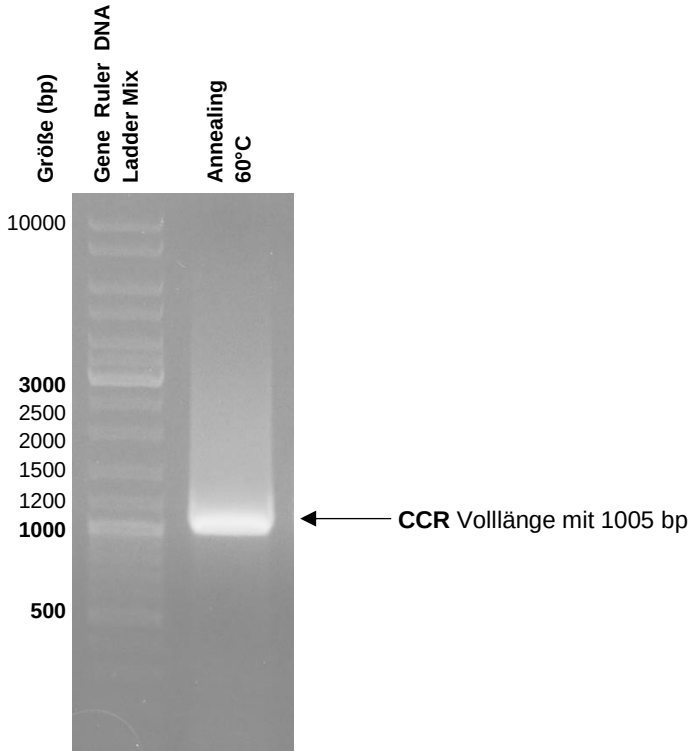


Abb. 33 Amplifizierte CCR Volllänge

Die CCR besitzt ein offenes Leseraster von 1005 Nukleotiden und wird aus 335 Aminosäuren gebildet. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 37081 Dalton und der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,02.

Die nachfolgenden, hellgrau unterlegten Aminosäuresequenzen beschreiben einen konservierten Bereich, welcher für die $NADP^+$ Bindung verantwortlich ist. Gelb unterlegte Sequenzabschnitte können sowohl NAD^+, als auch $NADP^+$ binden. Das aktive Zentrum (grüne Markierung) wird zusätzlich von den einzelnen, hellblau markierten Aminosäuren gebildet (Chao et al. 2017).

```
atgtctccggcatccaaccaaatcatttgtgtcaccggcgccggcggattcatagcttca
 M  S  P  A  S  N  Q  I  I  C  V  T  G  A  G  G  F  I  A  S
tggatggtcaaattgctattggacaaaggttatattgtcagaggaacagttagaaatcca
 W  M  V  K  L  L  L  D  K  G  Y  I  V  R  G  T  V  R  N  P
gatgatccgaagaatgtccatttgagagagcttgaaggtgcaaaggagagattaactcta
 D  D  P  K  N  V  H  L  R  E  L  E  G  A  K  E  R  L  T  L
tacaaagccgatcttctcgattttgagagcttgcgtgaagccattaatggctgtgacggt
 Y  K  A  D  L  L  D  F  E  S  L  R  E  A  I  N  G  C  D  G
gtttttcataccgcttctcccgttacagacgatcctgaacaaatggtggagccggcggtg
 V  F  H  T  A  S  P  V  T  D  D  P  E  Q  M  V  E  P  A  V
atcggaacaaagaatgtaatagtggcggcggctgaatctaaagtccggcgagttgtattc
 I  G  T  K  N  V  I  V  A  A  A  E  S  K  V  R  R  V  V  F
acatcgtcaatcggagctgtgtatatggatccacatcgtggtcctgatgatgttgttgat
 T  S  S  I  G  A  V  Y  M  D  P  H  R  G  P  D  D  V  V  D
gaaagctgctggagtgatcttgagttctgcaagaacaccaagaattggtattgctacggg
 E  S  C  W  S  D  L  E  F  C  K  N  T  K  N  W  Y  C  Y  G
aaagcggtggcagaacaggctgcatgggacgaggctaaggcgagagaggttgacttggtg
 K  A  V  A  E  Q  A  A  W  D  E  A  K  A  R  E  V  D  L  V
gtggttaacccggtgttggttttgggaccgttgttgcaacccacggtcaatgccagcatt
 V  V  N  P  V  L  V  L  G  P  L  L  Q  P  T  V  N  A  S  I
attcatatcctaaagtacctaaccggctcagcaaagacctatgccaattcagtccaagcc
 I  H  I  L  K  Y  L  T  G  S  A  K  T  Y  A  N  S  V  Q  A
tacgtccatgttagagatgtggcacttgcacacattctactctttgagactccttcagct
 Y  V  H  V  R  D  V  A  L  A  H  I  L  L  F  E  T  P  S  A
tcgggtcgctatctatgtgctgagagcgtgcttcaccgtggtgaagtcgtagaaattctc
 S  G  R  Y  L  C  A  E  S  V  L  H  R  G  E  V  V  E  I  L
gccaagtttttccctgaatacccaattcccaccaagtgttctgatgagataaagccaaga
 A  K  F  F  P  E  Y  P  I  P  T  K  C  S  D  E  I  K  P  R
gcaaagccatacaaattctcgaaccaaaagcttaaggatttaggtttggaatttacacca
 A  K  P  Y  K  F  S  N  Q  K  L  K  D  L  G  L  E  F  T  P
gtgaagcagtgtttatatgagacggtcaagagcttacaagagaagggtcacctgccggtg
 V  K  Q  C  L  Y  E  T  V  K  S  L  Q  E  K  G  H  L  P  V
caaccgaccgcccacaccgatgatcacatccgtatccagtctaat
 Q  P  T  A  H  T  D  D  H  I  R  I  Q  S  N
```

Eine Datenbank Analyse durch das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zeigte Ähnlichkeiten mit weiteren CCR Sequenzen aus unterschiedlichen Pflanzenarten. Die fünf höchsten Ähnlichkeiten zeigt die nachfolgende Tabelle 5 (Stand Februar 2021).

Tabelle 5 NCBI Datenbank Analyse für die CCR sortiert nach absteigender Identität/Übereinstimmung.

Nr.	Organismus	Identität	Sequenzlänge (bp)	EMBL Sequenz ID
1	*Cynara cardunculus var. scolymus*	94 %	1245	XM_025114650.1
2	*Helianthus annuus*	83 %	1396	XM_022162849.1
3	*Lactuca sativa*	83 %	1101	XM_023888269.1
4	*Codonopsis lanceolata*	82 %	1232	AB243011.1
5	*Camellia sinensis*	81 %	1507	XM_028210263.1

3.1 Expression der rekombinanten CCR

Da eine Expression des CCR Gens im Vektor pET15b geplant war, wurden an dem 5`-Ende der Sequenz eine NdeI- und am 3`-Ende eine XhoI Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die Expression der in pET15b eingebrachten Sequenz in SoluBL21 Zellen war erfolgreich. Mit Hilfe der Metallchelatchromatographie über eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni-NTA) konnte das heterolog exprimierte Protein isoliert und aufgereinigt werden. Abb. 34 zeigt eine Western Blot Membran mit den einzelnen Aufreinigungsfraktionen. Es konnten pro Expression Proteinmengen von bis zu 185 mg pro 100 ml Bakterienkultur erzielt werden.

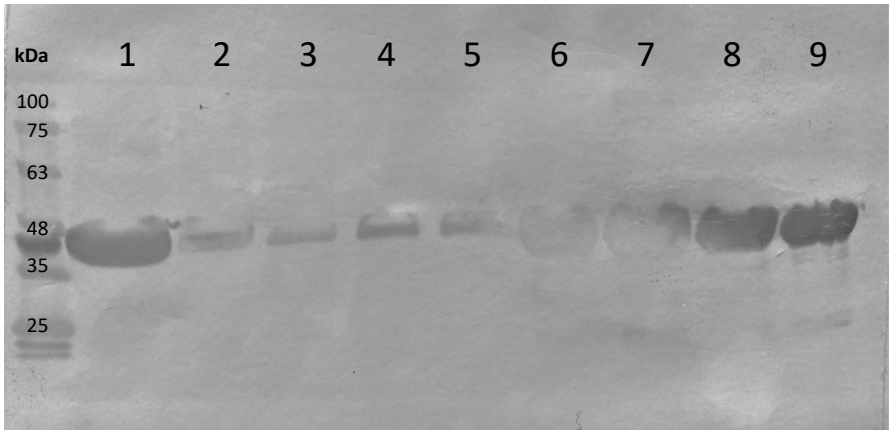


Abb. 34 CCR: Western Blot der Fraktionen einer Aufreinigung der mit *N*-terminalem 6x-His-tag versehenen CCR über Metallchelatchromatographie nach SDS-PAGE. Die Detektion erfolgte mit Maus-Anti-His-Antikörpern und Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern mit BCIP/NBT-Färbung: 1. Rohextrakt, 2. Durchfluss, 3. Waschen I, 4. Waschen II, 5. Waschen III; 6. Elution I, 7. Elution II, 8. Elution III 9. über PD 10-Säule umgepuffertes Enzym

3.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes

Für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurden zwei verschiedene Puffersysteme getestet. Sowohl das Substrat (Coenzym A Ester), als auch der Cofaktor ($NADPH_2$/$NADH_2$) und das Produkt (Aldehyd) besitzen ihr Absorptionsmaximum in demselben

Wellenlängenbereich zwischen 310 und 390 nm. Wegen dieser Überlagerung lassen sich die einzelnen Spektren in diesem Wellenlängenbereich nicht ausreichend voneinander trennen. Aus diesem Grund erfolgt die graphische Darstellung der Enzymaktivität in Abb. 35 als Abnahme der $NADPH_2$-Absorption bei 366 nm pro Zeiteinheit gegen den pH-Wert. Alle weiteren photometrischen Bestimmungen und Auswertungen bezüglich der CCR in diesem Kapitel erfolgten nach der Berechnungsmethode von Lüderitz und Griesebach (1971). Die höchste lineare Abnahme der Extinktion pro Sekunde ($\Delta E\ s^{-1}$) wurde im Britton-Robinson-Puffer pH 6,5 ermittelt.

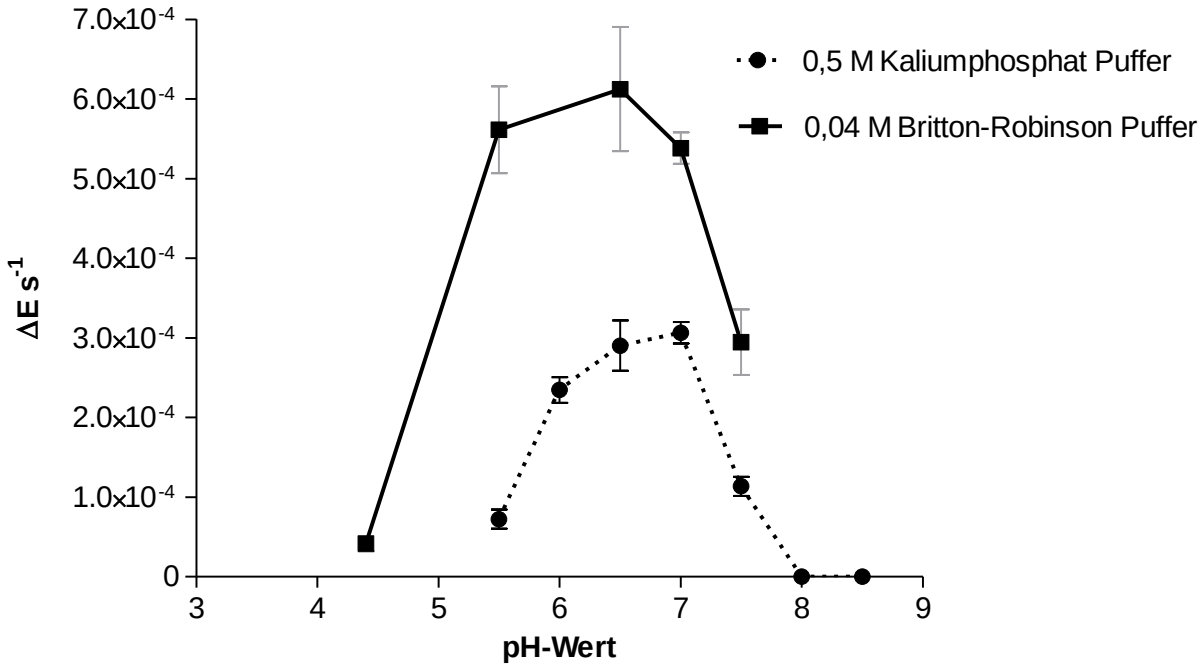


Abb. 35 CCR: Bestimmung des optimalen pH-Wertes der CCR (Substrat: 4-Cumaroyl-CoA, Cofaktor: $NADPH_2$, n = 3 ± Standardfehler).

3.3 Vergleich unterschiedlicher Hydroxycinnamoyl-CoA Thioester

Die CCR akzeptiert neben dem Feruloyl-CoA noch weitere Coenzym A Thioester als Substrate. Für den Vergleich wurden die enzymatischen Aktivitäten mit 4-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA, Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA gemessen und als Abnahme der $NADPH_2$ Absorption bei 366 nm pro Zeiteinheit und Proteingesamtmenge angegeben.

Dabei konnte die höchste Abnahme der $NADPH_2$ Absorption bei 366 nm pro Zeiteinheit und Proteingesamtmenge ($\Delta E\ s^{-1}\ kg^{-1}$) mit Feruloyl-CoA als Substrat bestimmt werden. Diese Aktivität dient als Vergleichswert zu den anderen Substraten und wurde auf 100 % gesetzt (Abb. 36). Die Absorptionsänderung ($\Delta E\ s^{-1}\ kg^{-1}$) liegt mit Sinapoyl-CoA als Substrat bei 52 %. Mit 4-Cumaroyl-CoA besitzt die CCR nur noch eine Absorptionsänderung von 3 %. Und mit Caffeoyl-CoA 2 %.

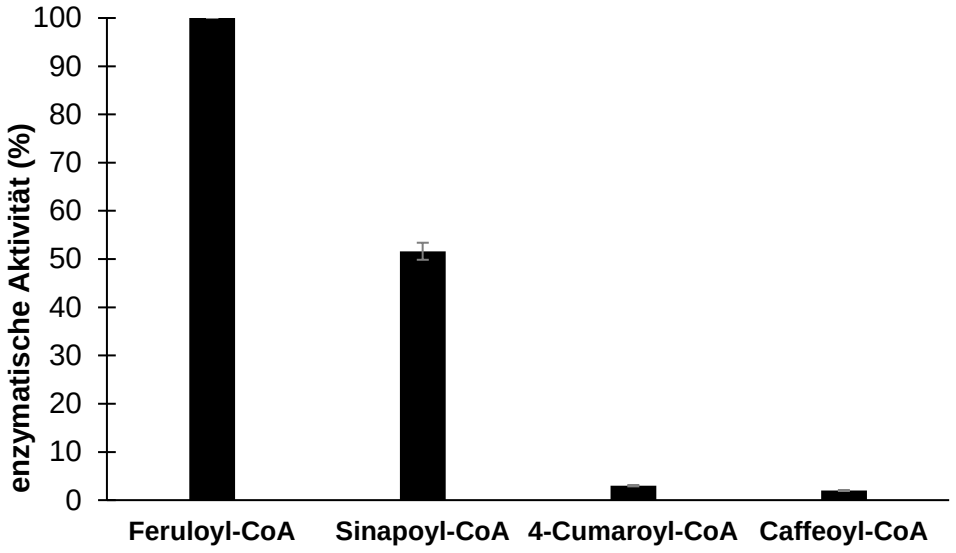


Abb. 36 CCR: Vergleich unterschiedlicher Hydroxycinnamoyl-CoA Thioester als Substrat (n = 3 ± Standardfehler).

3.4 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurde bei der CCR ein 0,1 M Natrium-Kalium-Phosphatpuffer pH 6,25 (Lüderitz und Griesebach 1971) verwendet. Die optimale Reaktionstemperatur liegt im Bereich zwischen 29 °C und 34 °C. Die nachfolgende Abb. 37 zeigt eine hohe spezifische Aktivität von 10,8 ± 0,9 mkat kg^{-1} bei einer Temperatur von 29,0 °C. Bei 33,7 °C beträgt die spezifische Aktivität 10,8 ± 0,6 mkat kg^{-1}.

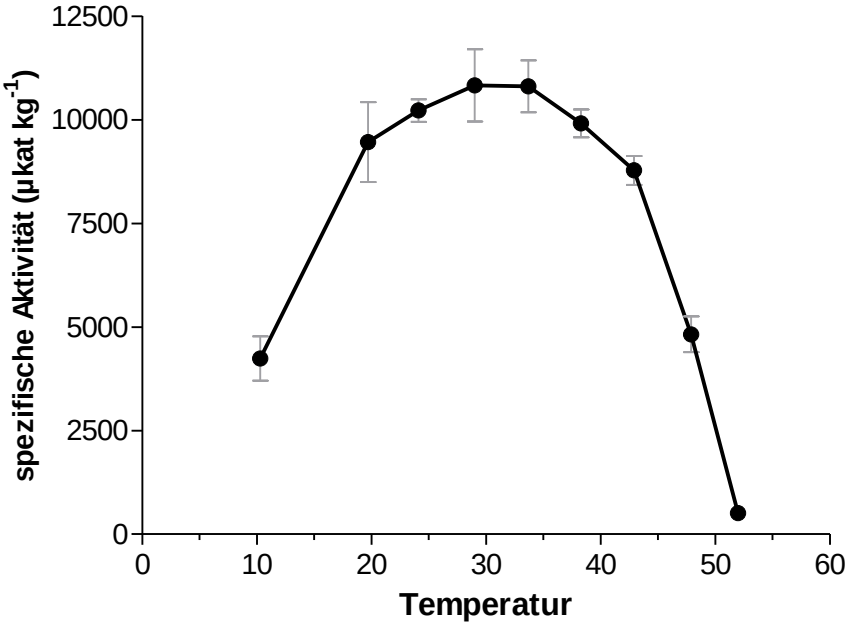


Abb. 37 CCR: Photometrische Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur der Cinnamoyl-CoA Reduktase. Substrat: Feruloyl-CoA, Cofaktor: $NADPH_2$ (n = 3 ± Standardfehler).

3.5 Enzymkinetik: Feruloyl-CoA (Cofaktor: $NADPH_2$)

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wurden Feruloyl-CoA-Konzentration zwischen 5 µM und 40 µM getestet. Die Konzentration des Cosubstrates $NADPH_2$ wurde im Ansatz auf 100 µM festgelegt. Die Messungen erfolgten photometrisch als Dreifachbestimmung bei drei biologischen Replikaten.

Für das Substrat Feruloyl-CoA betrug die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei der Michaelis-Menten-Auftragung (Abb. 38, links) 3561 ± 604 µkat kg^{-1} und der K_m-Wert 15,0 ± 2,9 µM.

Nach der Linearisierung durch eine doppelt reziproke Auftragung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung, Abb. 38, rechts) konnte für Feruloyl-CoA ein K_m-Wert von 39,6 ± 9,1 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 3567 ± 598 µkat kg^{-1}.

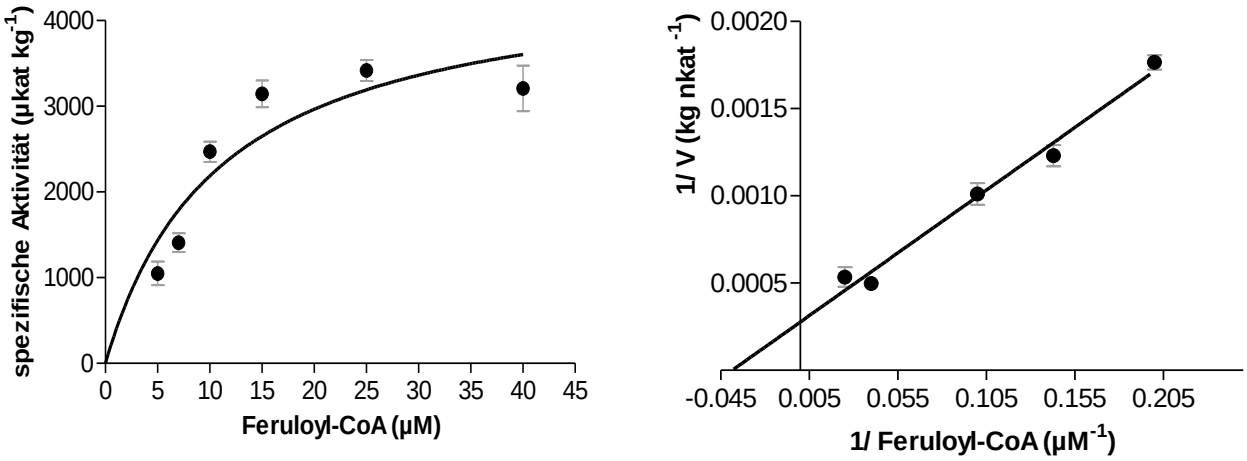


Abb. 38 CCR: links: Substratsättigungskurve für Feruloyl-CoA zur Bestimmung des K_m-Wertes. Cofaktor: 100 µM $NADPH_2$; rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Durch die Hanes-Woolf-Darstellung konnte für das Feruloyl-CoA ein K_m-Wert von 20,9 ± 9,4 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 3264 ± 953 µkat kg^{-1}.

Zusammenfassend konnten anhand der photometrischen Bestimmungsmethode und der unterschiedlichen Auswertungs- und Darstellungsmethoden die folgenden Werte für Feruloyl-CoA ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk**[1]	**Hanes-Woolf**[1]
K_m (µM)	15,0 ± 2,9	39,6 ± 9,1	20,9 ± 9,4
V_{max} (µkat kg^{-1})	3561 ± 604	5233 ± 1764	4140 ± 949
k_{cat} (s^{-1})	0,14 ± 0,02	0,21 ± 0,07	0,17 ± 0,04
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	$1{,}06 \cdot 10^4 \pm 3{,}21 \cdot 10^3$	$5{,}98 \cdot 10^3 \pm 2{,}18 \cdot 10^3$	$9{,}90 \cdot 10^3 \pm 2{,}93 \cdot 10^3$

3.6 Enzymkinetik: Feruloyl-CoA (Cofaktor $NADH_2$)

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für das Substrat Feruloyl-CoA mit $NADH_2$ als Cosubstrat wurde über die Cornish-Bowden-Methode ausgewertet. Mit steigender Substratkonzentration konnte keine Substratsättigung erreicht werden. Feruloyl-CoA Konzentrationen über 40 µM konnten aufgrund der starken Eigenabsorption der einzelnen Komponenten im Testansatz nicht weiter vermessen werden. Die kleinste Substratkonzentration betrug 2,5 µM. Die Konzentration des Cosubstrats $NADH_2$ wurde im Ansatz auf 100 µM festgelegt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung für drei biologischen Replikate.

Es konnte ein K_m-Wert für Feruloyl-CoA von 14,9 ± 1,9 µM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 469 ± 172 µkat kg^{-1} ermittelt werden (Abb. 39). Die Wechselzahl k_{cat} betrug 0,019 ± 0,007 s^{-1}. Die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m betrug $1{,}37 \cdot 10^3 \pm 5{,}90 \cdot 10^2$ s^{-1} M^{-1}.

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

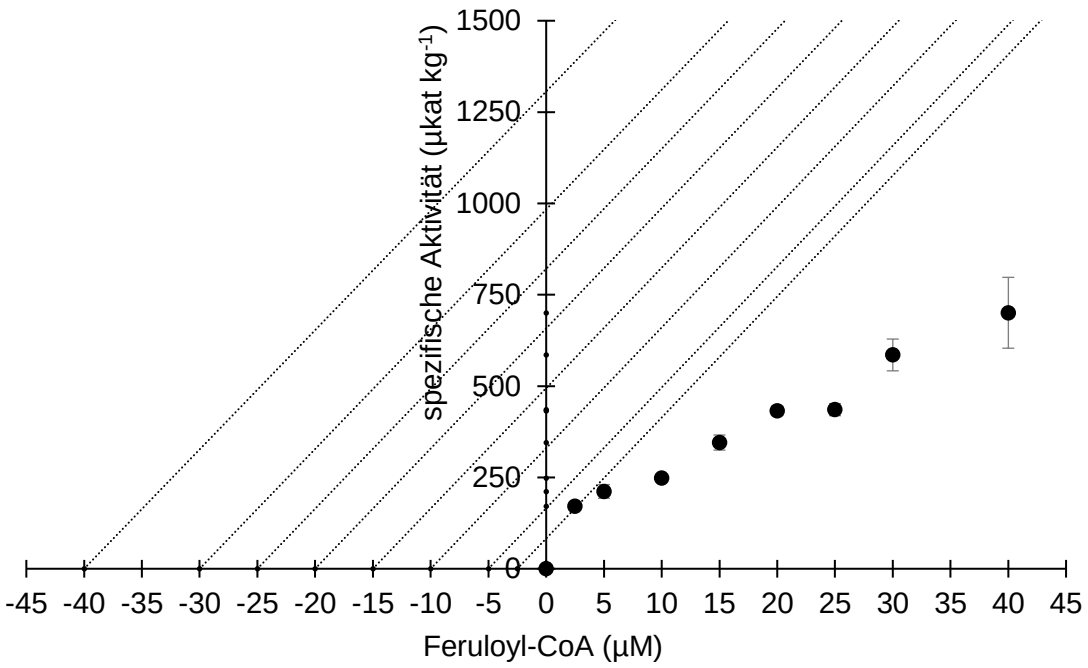


Abb. 39 CCR: Cornish-Bowden-Darstellung zur Bestimmung des K_m- und V_{max}-Wertes für Feruloyl-CoA (ein biologisches Replikat, n = 3 ± Standardfehler), Cosubstrat: $NADH_2$.

3.7 Enzymkinetik: $NADPH_2$ (Substrat Feruloyl-CoA)

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit für $NADPH_2$ als Cosubstrat betrug die geringste Konzentration 5 µM, die höchste 150 µM. Die Konzentration des Feruloyl-CoA wurde im Ansatz auf 25 µM festgelegt. Die Messungen erfolgten photometrisch als Dreifachbestimmung bei drei biologischen Replikaten. Bei der Michaelis-Menten-Darstellung (Abb. 40, links) konnte ein K_m-Wert von 22,9 ± 5,8 µM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 4310 ± 780 µkat kg^{-1} ermittelt werden.

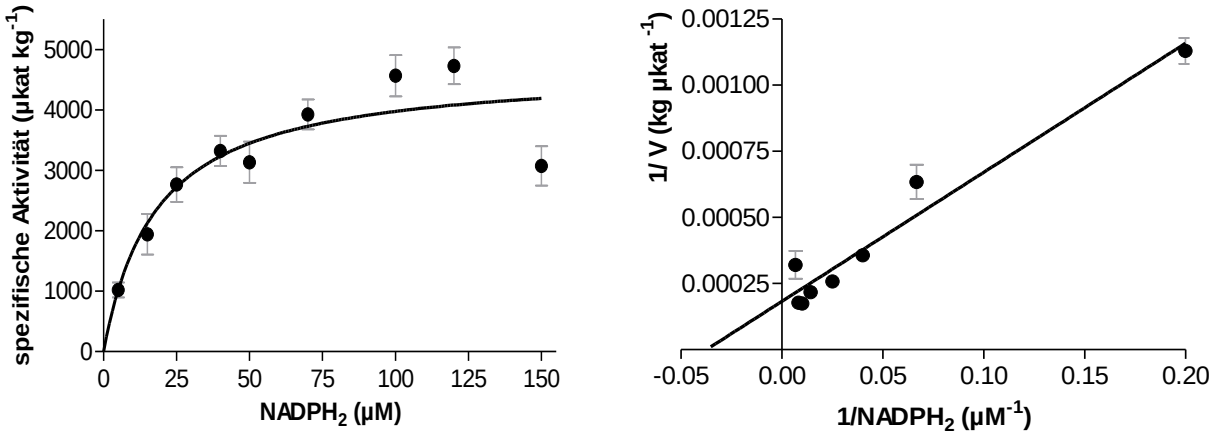


Abb. 40 links: Substratsättigungskurve für $NADPH_2$ zur Bestimmung des K_m-Wertes. Substrat: 25 µM Feruloyl-CoA; rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Nach der Linearisierung durch eine doppelt reziproke Auftragung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung, Abb. 40 rechts) konnte ein K_m-Wert für das $NADPH_2$ von 24,9 ± 7,6 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 3931 ± 895 µkat kg^{-1}.

Mit der Hanes-Woolf-Funktion konnte ein K_m-Wert von 24,1 ± 9,2 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 4285 ± 702 µkat kg^{-1}.

Zusammenfassend konnten anhand der unterschiedlichen Auswertungs- und Darstellungsmethoden die folgenden Werte für das Substrat Feruloyl-CoA ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk**[1]	**Hanes-Woolf**[1]
K_m (µM)	22,9 ± 5,8	24,9 ± 7,6	24,1 ± 9,2
V_{max} (µkat kg^{-1})	4310 ± 780	3931 ± 895	4285 ± 702
k_{cat} (s^{-1})	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,03
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	$1{,}05 \cdot 10^4 \pm 5{,}08 \cdot 10^3$	$8{,}54 \cdot 10^3 \pm 3{,}72 \cdot 10^3$	$1{,}05 \cdot 10^4 \pm 4{,}34 \cdot 10^3$

3.8 Enzymkinetik: $NADH_2$ (Substrat Feruloyl-CoA)

Die Bestimmung von K_m und V_{max} für $NADH_2$ wurde über die Cornish-Bowden-Methode durchgeführt (Abb. 41). Die Konzentration des Feruloyl-CoA wurde im Ansatz auf 25 µM festgelegt. Die niedrigste eingesetzte $NADH_2$ Konzentration betrug 5 µM. Die höchste noch

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

auswertbare Konzentration 150 µM. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung für drei biologische Replikate.

Es konnte für $NADH_2$ eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 685 ± 12 µkat kg^{-1} ermittelt werden. Der K_m-Wert beträgt 68 ± 7 µM und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m 421 ± 57 s^{-1} M^{-1}. Die Wechselzahl k_{cat} betrug $2{,}79 \cdot 10^{-2} \pm 5{,}04 \cdot 10^{-4}$ s^{-1}.

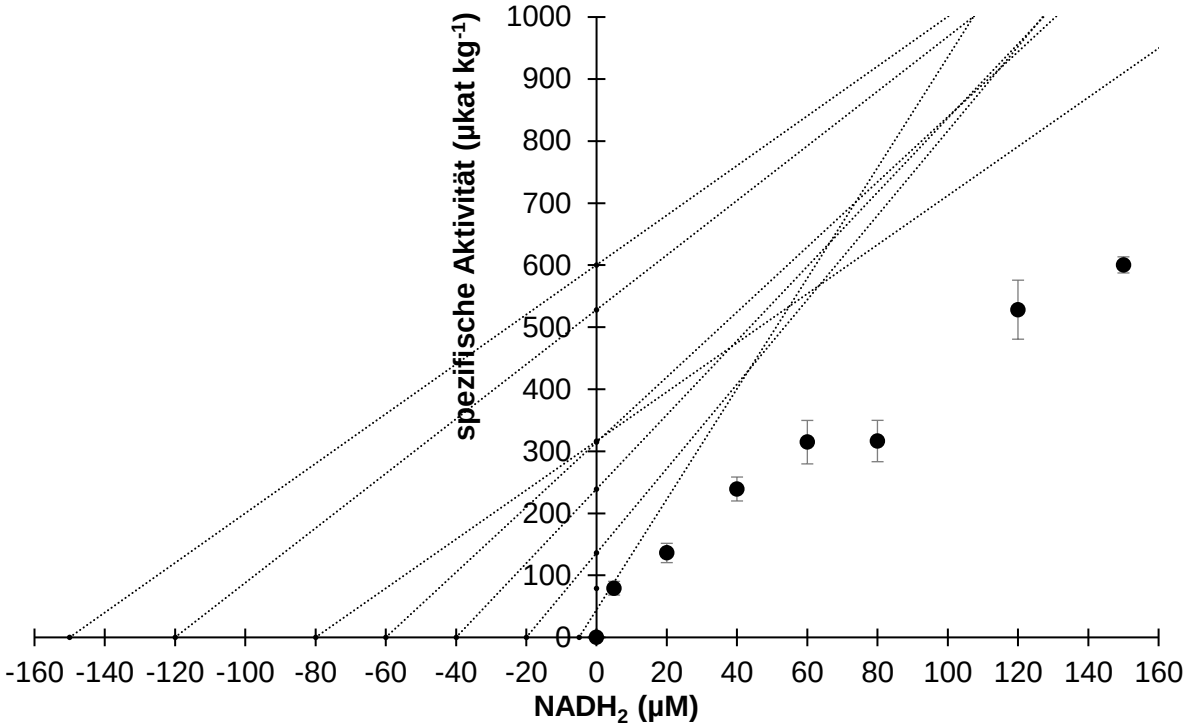


Abb. 41 CCR: Cornish-Bowden-Darstellung zur Bestimmung der K_m- und V_{ma}-Werte für Feruloyl-CoA (ein biologisches Replikat, n = 3 ± Standardfehler), Cosubstrat: $NADH_2$.

3.9 Enzymkinetik: Sinapoyl-CoA (Cofaktor: $NADPH_2$)

Auch die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit für das Substrat Sinapoyl-CoA wurde über die Cornish-Bowden-Methode durchgeführt (Abb. 42). Die niedrigste Substratkonzentration betrug 2,5 µM. Aufgrund der starken Eigenabsorption konnten Sinapoyl-CoA-Konzentrationen größer 60 µM im Testansatz nicht vermessen werden. Die Konzentration des Cosubstrats $NADPH_2$ im Ansatz wurde auf 100 µM festgelegt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung für drei biologische Replikate.

Es konnte für Sinapoyl-CoA ein V_{max} von 990 ± 132 µkat kg^{-1} ermittelt werden. Der K_m-Wert beträgt 21,3 ± 3,3 µM und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m $1{,}93 \cdot 10^3 \pm 2{,}26 \cdot 10^2$ s^{-1} M^{-1}. Die Wechselzahl k_{cat} betrug $4{,}02 \cdot 10^{-2} \pm 5{,}37 \cdot 10^{-3}$ s^{-1}.

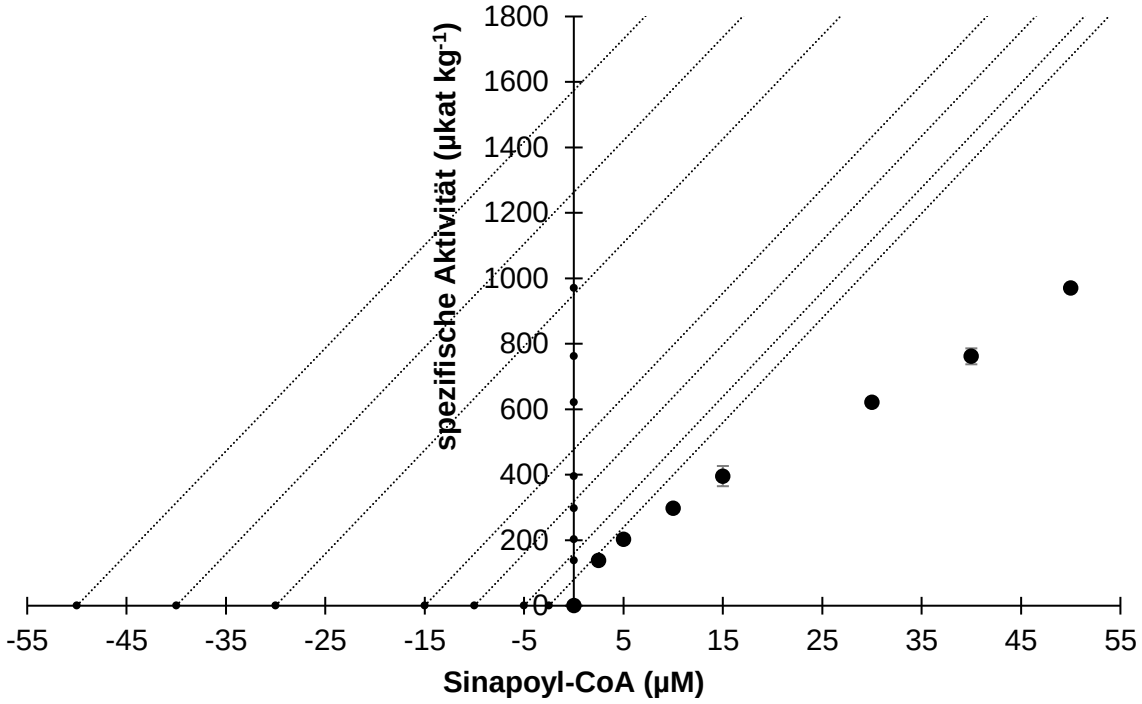


Abb. 42 CCR Cornish-Bowden-Darstellung zur Bestimmung der K_m- und V_{max}-Werte für Sinapoyl-CoA (ein biologisches Replikat, n = 3 ± Standardfehler), Cosubstrat: $NADPH_2$.

4. Chalkonsynthase (CHS)

Das Gen der Chalkonsynthase aus *Silybum marianum* ist bereits seit 2015 vollständig identifiziert (Sanjari et al.) und seit März 2018 in der Datenbank des NCBI eingetragen (JN182806). Eine rekombinante Expression, sowie eine enzymatische Charakterisierung erfolgte in der oben genannten Arbeitsgruppe jedoch nicht.

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion und zwei Volllängenprimern konnte die Chalkonsynthase aus DNA eines *S. marianum* Sämlings (Pflanzenwachstum bis ca. 10 cm) amplifiziert werden. Da es sich bei dem Ausgangsmaterial jedoch um genomische DNA handelte, enthielt die Sequenz einen nicht-codierenden Intronbereich von 208 bp (Abb. 43).

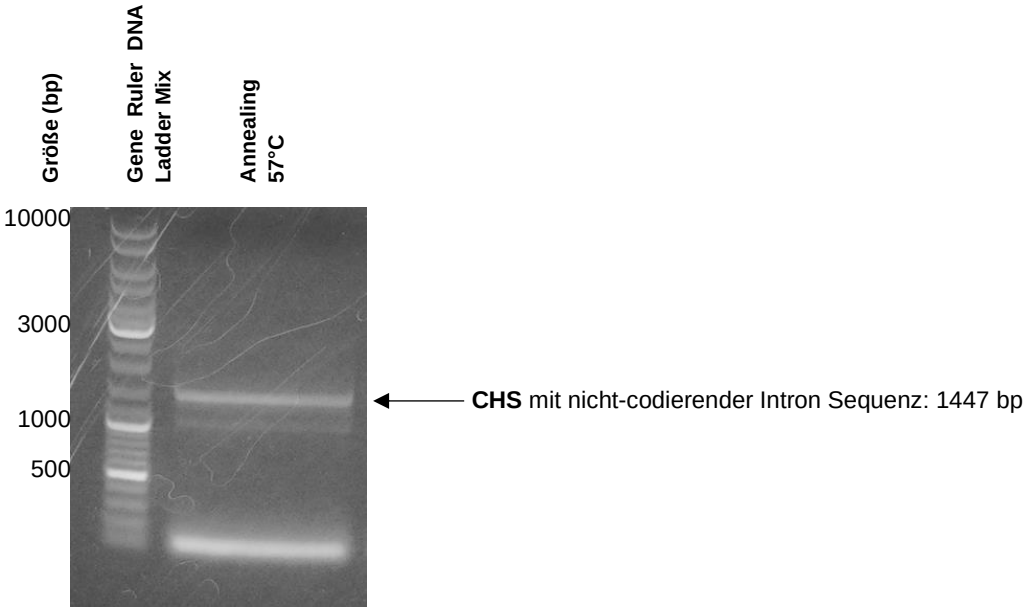


Abb. 43 Amplifizierte CHS Volllänge aus genomischer DNA. Produkt enthält einen nicht-codierenden Intronbereich.

Dieser nicht-codierende Bereich konnte nachfolgend durch die Fusions-PCR (Material und Methoden Kapitel 16.5) erfolgreich entfernt werden. Abb. 44 zeigt in den ersten beiden Spuren des Agarosegels die CHS Teilfragmente A und B. In der dritten Spur ist die amplifizierte und fusionierte CHS Volllänge ohne Intron.

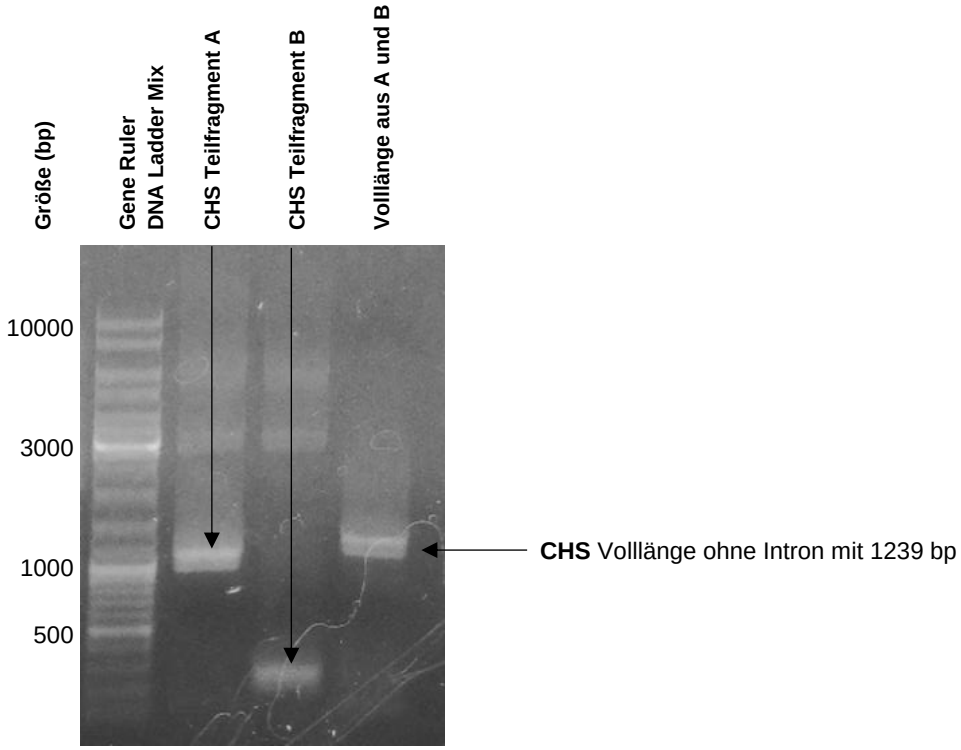


Abb. 44 Fusions-PCR, 1. CHS Teilfragment A, 2. CHS Teilfragment B, 3. fusionierte CHS Volllänge ohne Intron (Annealing Temperaturen 60 °C)

Die CHS besitzt ein offenes Leseraster von 1239 Nukleotiden, die 713 Aminosäuren codieren. Das Molekulargewicht beträgt 45081 Dalton und der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,07. Das stark konservierte aktive Zentrum (hellgraue Markierung) wird durch einzelne katalytisch aktive Aminosäuren (blaue Markierung) ergänzt.

Der gelb markierte Sequenzabschnitt bildet die Malonyl-CoA Bindedomäne. Ein weiterer konservierter Sequenzabschnitt (grüne Markierung) ist ein stark konservierter Sequenzbereich innerhalb der CHS-Familie (Sun et al. 2015, Fliegmann 2002).

```
atggcatcctcatcaattgatattgcagagatcagaaaagcacaacgggcacaaggtccg
 M  A  S  S  S  I  D  I  A  E  I  R  K  A  Q  R  A  Q  G  P
gccaccattctcgccatcggcactgccactcctgccaattgtatctatcaagccgattat
 A  T  I  L  A  I  G  T  A  T  P  A  N  C  I  Y  Q  A  D  Y
ccagattattattttcggatcaccaacagcgaacacatggtcgatctcaaagagaaattc
 P  D  Y  Y  F  R  I  T  N  S  E  H  M  V  D  L  K  E  K  F
aagcgcatgtgtgacaagtctatgataagaaagcgatacatgcacatcacagaggagttt
 K  R  M  C  D  K  S  M  I  R  K  R  Y  M  H  I  T  E  E  F
ctaaaagaaaacccaaacatgtgcgaatacatggctccatcccttgacgcccgtcaggat
 L  K  E  N  P  N  M  C  E  Y  M  A  P  S  L  D  A  R  Q  D
gtggtggtcgtcgaagtccccaagctcggtaaagaagcagccacaaaagccatcaaagaa
 V  V  V  V  E  V  P  K  L  G  K  E  A  A  T  K  A  I  K  E
tggggaaacccgaaatcaaagatcactcatctcatcgtctgcaccacctccggtgtcgac
 W  G  N  P  K  S  K  I  T  H  L  I  V  C  T  T  S  G  V  D
atgcctggtgccgactaccagatcaccaagctccttggcctccgcccttctgtcaaacga
 M  P  G  A  D  Y  Q  I  T  K  L  L  G  L  R  P  S  V  K  R
```

```
ttcatgatgtaccaacaagggtgttttgcaggaggcacggttctccgtctcgctaaggac
 F  M  M  Y  Q  Q  G  C  F  A  G  G  T  V  L  R  L  A  K  D
attgcggaaaacaacaagggttctcgtgttcttgtggtttgctcagagatcacagcggtt
 I  A  E  N  N  K  G  S  R  V  L  V  V  C  S  E  I  T  A  V
actttccgtggaccaaacgacacccatcttgattccctcgttggtcaggctttgtttggt
 T  F  R  G  P  N  D  T  H  L  D  S  L  V  G  Q  A  L  F  G
gatggagctgcagcgatcatcgtgggtgcggaccctgacttgaagacagagaggccgttg
 D  G  A  A  A  I  I  V  G  A  D  P  D  L  K  T  E  R  P  L
tttgagatggtgtcagctgctcagaccatcttaccagactcagagggtgccattgatgga
 F  E  M  V  S  A  A  Q  T  I  L  P  D  S  E  G  A  I  D  G
cacttgagagaggtggggctaacgtttcatcttcttaaagatgtgccagggttgatttca
 H  L  R  E  V  G  L  T  F  H  L  L  K  D  V  P  G  L  I  S
aagaacatagagaaggcactgatacaggccttttctcctttgggtataaccgattggaac
 K  N  I  E  K  A  L  I  Q  A  F  S  P  L  G  I  T  D  W  N
tccatcttctggatcgcccaccctggtggtccggcgatactggaccaggtggagcaaaaa
 S  I  F  W  I  A  H  P  G  G  P  A  I  L  D  Q  V  E  Q  K
ctgggtctcaaggaggagaagatgagagccactagacatgtgctgagcgagtacggcaac
 L  G  L  K  E  E  K  M  R  A  T  R  H  V  L  S  E  Y  G  N
atgtcgagtgcctgcgtgttgttcatcattgacgagatgaggaagaagtcggcggcggag
 M  S  S  A  C  V  L  F  I  I  D  E  M  R  K  K  S  A  A  E
ggcgccaccaccaccggtgaaggtcttgattggggtgttttgtttggattcggtcctggt
 G  A  T  T  T  G  E  G  L  D  W  G  V  L  F  G  F  G  P  G
ttgacagtggagacggtggtccttcacagcctgcccacggccaccatgccgattgccacc
 L  T  V  E  T  V  V  L  H  S  L  P  T  A  T  M  P  I  A  T
caaaatttatcacaacaagtcgtaattaatcatgaatga
 Q  N  L  S  Q  Q  V  V  I  N  H  E  -
```

Die NCBI Datenbank Analyse durch das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) zeigte Ähnlichkeiten mit anderen CHS Sequenzen aus unterschiedlichen Pflanzenarten. Die fünf höchsten Ähnlichkeiten, alle für Arten der Asteraceae, zeigt die nachfolgende Tabelle 6 (Stand Februar 2021).

Tabelle 6 NCBI Datenbank Analyse für die CHS sortiert nach absteigender Identität/Übereinstimmung.

Nr.	Organismus	Identität	Sequenzlänge (bp)	EMBL Sequenz ID
1	*Silybum marianum*	99 %	1406	JN182806.1
2	*Cynara cardunculus var. scolymus*	92 %	1304	XM_025115139.1
3	*Lactuca sativa*	87 %	1400	XM_023879789.1
4	*Carthamus tinctorius*	88 %	1566	LC128420.1
5	*Centaurea cyanus*	86 %	1194	MK732538.1

4.1 Expression rekombinanter CHS

Da eine Expression des Chalkonsynthase Gens im Vektor pET15b geplant war, wurden an dem 5`-Ende der Sequenz eine NdeI- und am 3`-Ende eine XhoI Schnittstelle eingefügt. Da die Ligation in den Expressionsvektor pET15b nicht erfolgreich war, wurde hierfür die In-Fusion homologe Rekombinationsmethode verwendet. Zunächst wurde mit Hilfe von speziell modifizierten Volllängenprimern eine In-Fusion Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Die

Primer enthielten neben einer überlappenden Sequenz des pET15b Vektors eine passende Restriktionsschnittstelle (5`-Ende: NdeI; 3`-Ende: XhoI) und 15 Basenpaare der CHS Volllänge. Die darauffolgende In-Fusion Ligation in den Expressionsvektor, die Transformation von SoluBL21 Zellen sowie die Proteinexpression waren erfolgreich. Eine anschließende Aufreinigung durch Chromatographie über eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni-NTA) war ebenfalls erfolgreich (Abb. 45). Hierbei konnten pro Expression in einer 100 ml Bakterienkultur eine Proteinmenge von bis zu 94 mg isoliert werden.

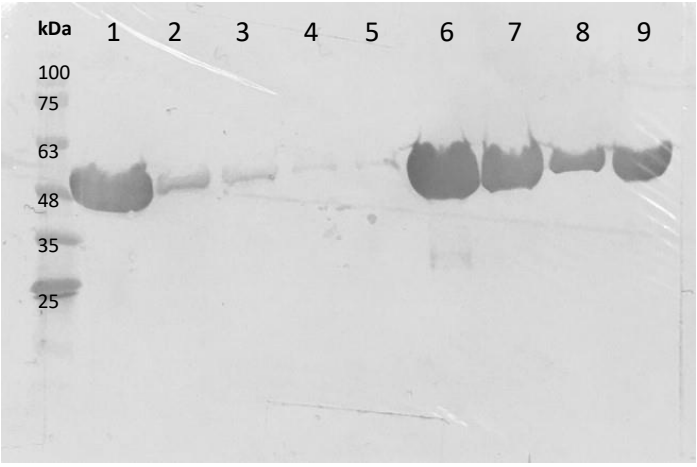


Abb. 45 CHS: Western Blot der Fraktionen einer Aufreinigung der mit *N*-terminalem 6x-His-tag versehenen CHS über Metallchelatchromatographie nach SDS-PAGE. Die Detektion erfolgte mit Maus-Anti-His-Antikörpern und Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern mit BCIP/NBT-Färbung: 1. Rohextrakt, 2. Durchfluss, 3. Waschen I, 4. Waschen II, 5. Waschen III; 6. Elution I, 7. Elution II, 8. Elution III 9. über PD 10-Säule umgepuffertes Enzym.

4.2 Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers und pH-Wertes

Für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurden zwei unterschiedliche Puffersysteme getestet. Die höchste spezifische Enzymaktivität von 442 mkat kg^{-1} wurde im 0,5 M Tris/HCl Puffer bei pH 7,7 ermittelt (Abb. 46). Im Kaliumphosphat-Puffer liegt das pH-Optimum dagegen leicht niedriger bei pH 7,5 mit einer spezifischen Aktivität von 255 mkat kg^{-1}.

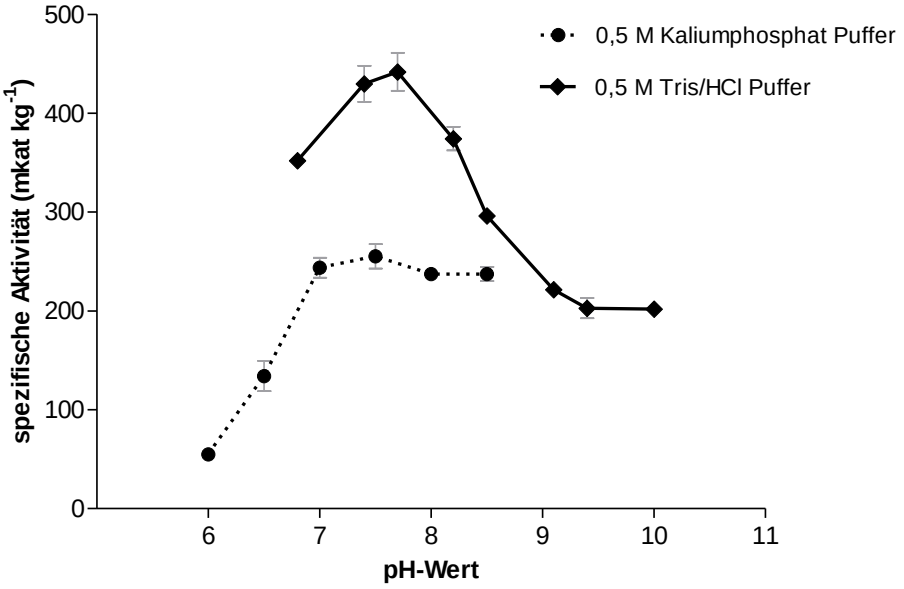


Abb. 46 CHS: Bestimmung des optimalen pH-Wertes der rekombinant exprimierten CHS aus der Mariendistel (n = 3 ± Standardfehler).

4.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurde bei der CHS ein 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 7,7 verwendet. Die nachfolgende Abb. 47 zeigt eine hohe spezifische Aktivität von 1404 ± 61 mkat kg^{-1} am Temperaturoptimum von 40 °C.

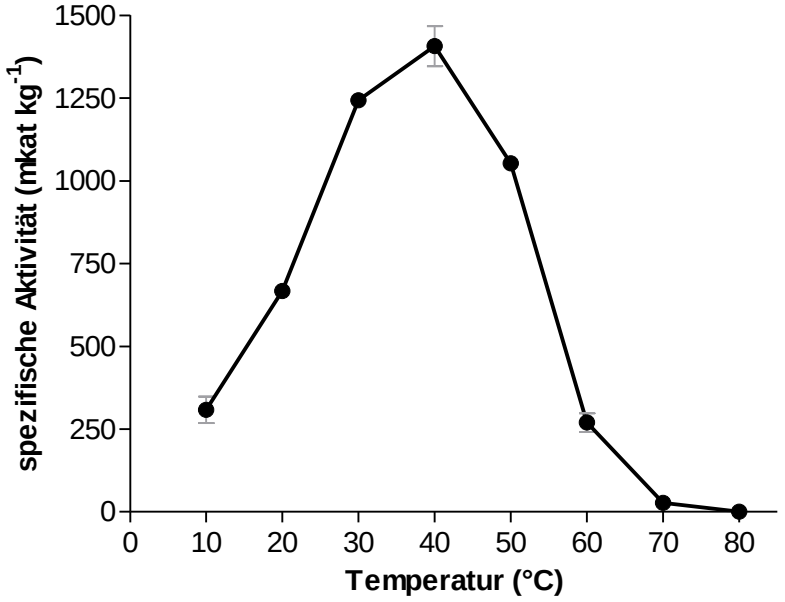


Abb. 47 CHS: Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur der CHS (n = 3 ± Standardfehler).

4.4 Bestimmung der CHS Aktivität mit Caffeoyl-CoA als Substrat

Es konnte keine enzymatische Aktivität mit Caffeoyl-CoA in Kombination mit Malonyl-CoA nachgewiesen werden.

4.5 Enzymkinetik: Malonyl-CoA

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Konzentration des 4-Cumaroyl-CoA im Ansatz auf 75 µM festgelegt. Die Malonyl-CoA Substratkonzentrationen betrugen zwischen 5 µM und 100 µM. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmungen bei drei biologischen Replikaten. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für das Substrat Malonyl-CoA betrug bei der Michaelis-Menten-Auftragung (Abb. 48, links) 2580 ± 535 mkat kg^{-1}. Der K_m-Wert für Malonyl-CoA konnte mit 12,0 ± 1,2 µM bestimmt werden.

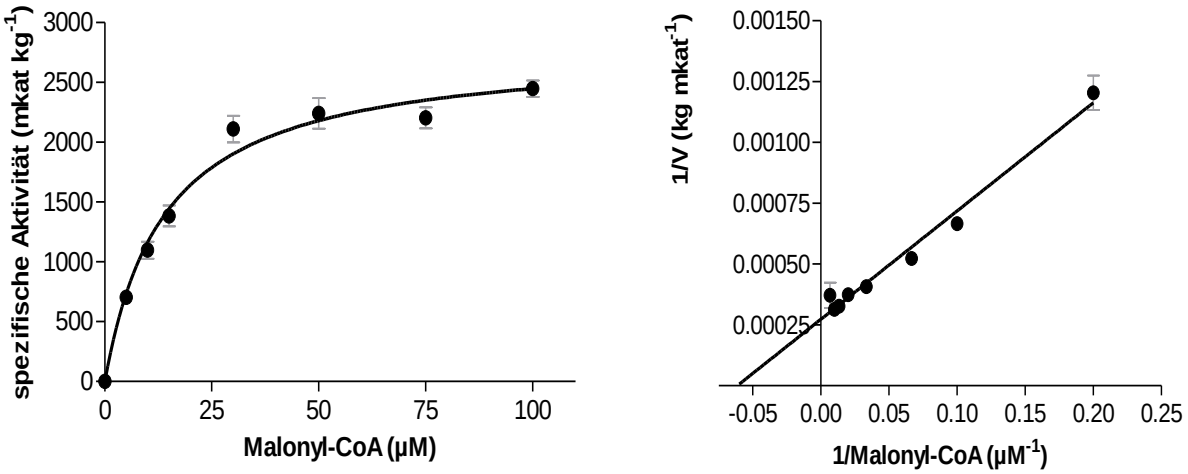


Abb. 48 CHS: links: Substratsättigungskurve für Malonyl-CoA zur Bestimmung des K_m-Wertes, zweites Substrat: 75 µM 4-Cumaroyl-CoA; rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Mit der Lineweaver-Burk-Darstellung (Abb. 48, rechts) konnte für Malonyl-CoA ein K_m-Wert von 14,4 ± 0,9 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 2672 ± 555 mkat kg^{-1}. Durch das Hanes-Woolf-Diagramm konnte für Malonyl-CoA ein K_m-Wert von 11,9 ± 2,2 µM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 2524 ± 379 mkat kg^{-1} bestimmt werden.

Zusammenfassend konnten anhand der Bestimmungsmethode und der unterschiedlichen Auswertungs- und Darstellungsmethoden die folgenden Werte für Malonyl-CoA ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	Lineweaver-Burk[1]	Hanes-Woolf[1]
K_m (µM)	12,0 ± 1,2	14,4 ± 0,9	11,9 ± 2,2
V_{max} (mkat kg^{-1})	2580 ± 535	2672 ± 555	2524 ± 379
k_{cat} (s^{-1})	122 ± 25	126 ± 26	119 ± 18
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	$1{,}01 \cdot 10^7 \pm 1{,}74 \cdot 10^6$	$8{,}64 \cdot 10^6 \pm 1{,}32 \cdot 10^6$	$1{,}14 \cdot 10^7 \pm 3{,}86 \cdot 10^6$

4.6 Enzymkinetik: 4-Cumaroyl-CoA

Für die Bestimmung des K_m und des V_{max} wurde die Konzentration des Malonyl-CoA im Ansatz auf 150 µM festgelegt. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmungen bei drei biologischen Replikaten. Die geringste 4-Cumaroyl-CoA Substratkonzentration betrug 2,5 µM, die höchste 20 µM.

Bei der Michaelis-Menten-Auftragung (Abb. 49, links) betrug die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für das Substrat 4-Cumaroyl-CoA 2676 ± 446 mkat kg^{-1}. Der K_m-Wert für das Substrat konnte auf 1,49 ± 0,36 µM bestimmt werden.

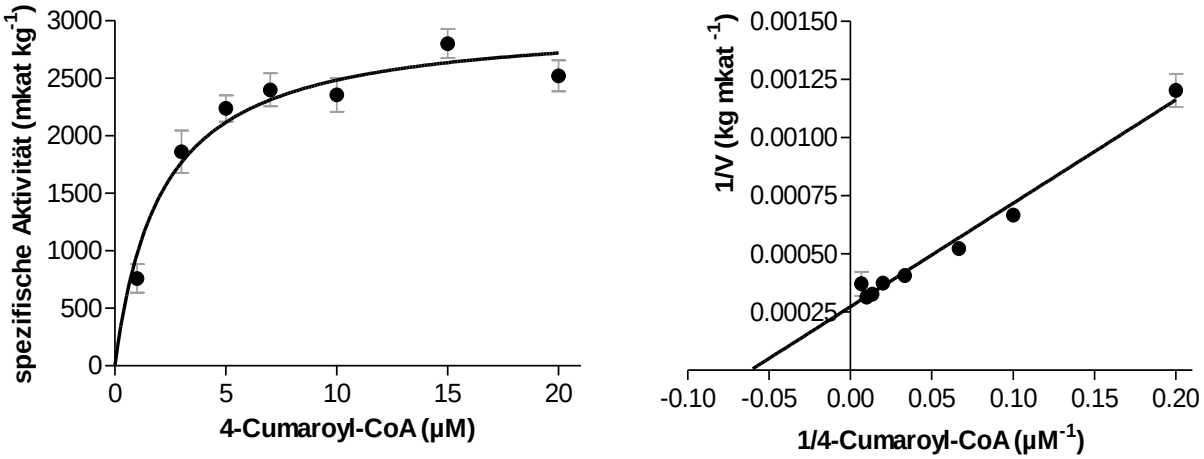


Abb. 49 CHS: links: Substratsättigungskurve für 4-Cumaroyl-CoA zur Bestimmung des K_m-Wertes. Zweites Substrat: 150 µM Malonyl-CoA; rechts: Lineweaver-Burk-Darstellung der Werte aus der Substratsättigungskurve (ein biologisches Replikat mit n = 3 ± Standardfehler).

Nach der Linearisierung der Werte (Lineweaver-Burk-Darstellung Abb. 49, rechts) konnte für das Substrat 4-Cumaroyl-CoA ein K_m-Wert von 1,48 ± 0,23 µM errechnet werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 2665 ± 443 mkat kg^{-1}.

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

Anhand des Hanes-Woolf-Linearisierungsverfahren konnte für das 4-Cumaroyl-CoA ein K_m-Wert von 1,13 ± 0,27 µM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 2338 ± 407 mkat kg^{-1} bestimmt werden.

Zusammenfassend konnten anhand der unterschiedlichen Auswertungs- und Darstellungsmethoden die folgenden Werte für das 4-Cumaroyl-CoA Substrat ermittelt werden:

	Michaelis-Menten[1]	**Lineweaver-Burk**[1]	**Hanes-Woolf**[1]
K_m (µM)	1,49 ± 0,36	1,48 ± 0,23	1,13 ± 0,27
V_{max} (mkat kg^{-1})	2676 ± 446	2665 ± 443	2338 ± 407
k_{cat} (s^{-1})	127 ± 21	126 ± 20	111 ± 19
k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})	$9{,}99 \cdot 10^7 \pm 3{,}80 \cdot 10^7$	$9{,}50 \cdot 10^7 \pm 3{,}08 \cdot 10^7$	$1{,}20 \cdot 10^8 \pm 4{,}92 \cdot 10^7$

[1] Alle angegebenen Werte wurden jeweils aus den Mittelwerten von drei biologischen Replikaten (n=3x3) ± Standardfehler berechnet.

5. Peroxidase

Die Volllänge einer Peroxidase aus *S. marianum* wurde bereits 2017 von Dr. L. Poppe identifiziert und amplifiziert. Das Peroxidase Protein hat eine Länge von 322 Aminosäuren und enthält ein Signalpeptid. Darüber hinaus besitzt das Enzym *N*-Glykosylierungen. Beides ist für die Proteinstruktur und die enzymatische Aktivität von großer Bedeutung. Die Anzahl der *N*-Glykosylierungen am Protein variieren dabei stark.

Im Rahmen seiner Arbeit konnte Dr. Poppe die Peroxidase mit InvSc1 Hefezellen erfolgreich exprimieren. Aufgrund der *N*-Glykosylierung schwankte die (Glyco-)Proteinmasse zwischen 35 kDa und 65 kDa. Der Nachweis der Enzymaktivität war jedoch negativ.

5.1 Expression in *Physcomitrium patens*

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Expression der Peroxidase aus *S. marianum* das Blasenmützenmoos gewählt. Das Blasenmützenmoos *P. patens* ist ein Modellorganismus, dessen Genom 2008 (Rensing et al. 2008) publiziert wurde. Als Expressionswirt ist das Moos nicht nur sehr kostengünstig, sondern auch in der Handhabung und Kultivierung sehr einfach. *Physcomitrium patens* ist in der Lage, ähnlich den höheren Pflanzen, posttranslationale Proteinmodifikationen durchzuführen (Koprivova et al. 2003). Neben der Ausbildung von Disulfidbrücken ist das Moos in der Lage, 19 verschiedene Oligosaccharide über Aminogruppen an Proteine zu knüpfen (Viëtor et al. 2003).

Die Amplifikation und Ligation des Peroxidase Zielgens in die entsprechenden Vektoren erfolgte durch Dr. Julia Wohl (2020; Anleitung siehe Kapitel 2.11 in ihrer Arbeit). Nach Ablauf der 14-tägigen Expressionszeit wurde das Zellmaterial aufgeschlossen und mittels Nickel-NTA Chromatographie aufgereinigt. Abb. 50 zeigt den Western Blot mit den einzelnen Aufreinigungsfraktionen. Die Elutionsfraktionen zeigen zwei Banden bei einer Größe von ca. 30 kDa und 75 kDa. Eine Peroxidaseaktivität konnte nur im Rohextrakt, dem Durchfluss und der ersten Waschfraktion nachgewiesen werden und stammt daher mit großer Wahrscheinlichkeit vom Expressionsorganismus.

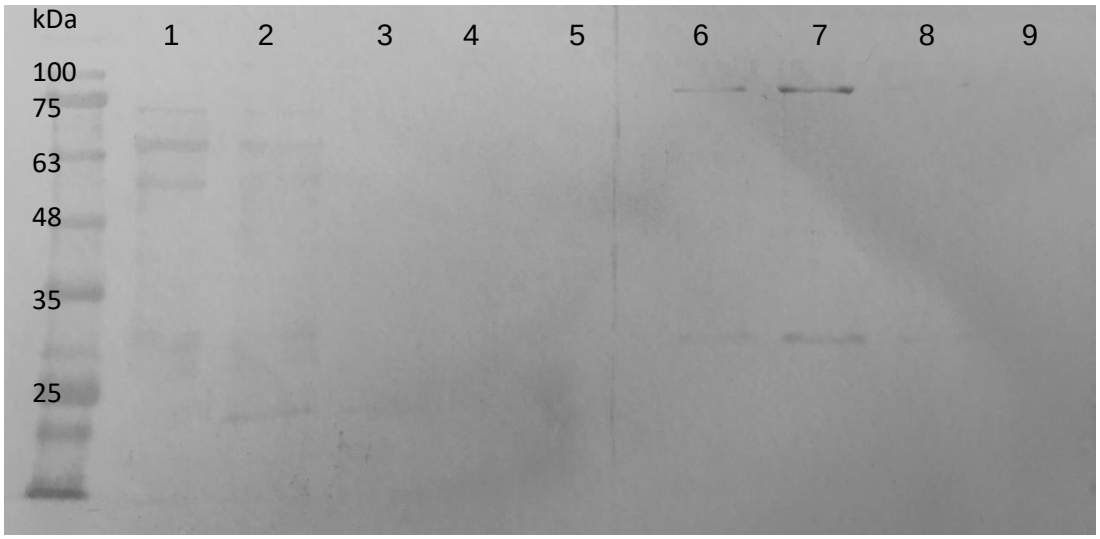


Abb. 50 Peroxidase: Western Blot der Fraktionen einer Aufreinigung der mit *N*-terminalem 6x-His-tag versehenen Peroxidase über Metallchelatchromatographie nach SDS-PAGE. Die Detektion erfolgte mit Maus-Anti-His-Antikörpern und Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern mit BCIP/NBT-Färbung: 1. Rohextrakt, 2. Durchfluss, 3. Waschen I, 4. Waschen II, 5. Waschen III; 6. Elution I, 7. Elution II, 8. Elution III 9. über PD 10-Säule umgepuffertes Enzym.

Als Negativkontrolle wurde analog zu der mit der Peroxidase transformierten Kultur eine Kultur des *P. patens* Wildtyps angelegt. Nach einer 14-tägigen Inkubationszeit wurde die Wildtypkultur ebenfalls über die Nickel-NTA Chromatographie aufgereinigt. Die nachfolgend durchgeführte SDS-PAGE sowie der Western Blot zeigten keine Proteinbanden in den Elutionsfraktionen. Eine Peroxidaseaktivität konnte hier ebenfalls nur im Rohextrakt, dem Durchfluss und der ersten Waschfraktion nachgewiesen werden.

Weitere Expressionsversuche des Peroxidase Gens in *P. patens* blieben leider erfolglos.

6. Dirigierende Proteine 1 und 2 (DIR 1 und DIR 2)

Die Volllängen der dirigierenden Proteine 1 und 2 aus *S. marianum* wurden ebenfalls von Dr. Poppe (2017) identifiziert und amplifiziert. Das DIR 1 Protein besitzt eine Größe von 189 Aminosäuren. Das DIR 2 dagegen hat eine Länge von 188 Aminosäuren. Beide Proteine enthalten ein Signalpeptid und besitzen *N*-Glykosylierungen. Im Rahmen seiner Arbeit konnte Dr. Poppe das dirigierende Protein 2 mit InvSc1 Hefezellen erfolgreich exprimieren. Mithilfe des Western Blots konnte er zwei klar voneinander getrennte Banden bei 25 und 27 kDa nachweisen.

6.1 Expression in *Physcomitrium patens*

Für die rekombinante Expression von Proteinen im Blasenmützenmoos müssen zunächst stabile Transformanten herangezogen werden. Diese Transformanten enthalten in ihrem Genom die Sequenz des Zielgens. Für das DIR 1 war die Transformation und Anzucht von Transformanten leider nicht erfolgreich. Eine Expression konnte nicht durchgeführt werden.

Für DIR 2 wurde analog zur Peroxidase nach dem Ablauf der 14-tägigen Expressionszeit das Zellmaterial aufgeschlossen und mittels Nickel-NTA Chromatographie aufgereinigt. Die nachfolgend durchgeführte SDS-PAGE sowie ein Western Blot zeigten keine Proteinbanden in den löslichen und unlöslichen Fraktionen.

6.2 Expression in *SuperMan5-20* GlycoSwitch® *Pichia*

Ein alternatives Expressionssystem zum Blasenmützenmoos bildet der *Pichia pastoris* SuperMan5-20 Glycoswitch® Hefestamm. Der Stamm verhindert die Ausbildung von Hypermannosylierungen (Effenberger et al. 2017), die zu einer Fehlfaltung des Proteins führen und somit die enzymatische Aktivität erheblich (negativ) beeinflussen können.

Nach Ligation der Volllängen des dirigierenden Proteins 1 und 2 in den hefespezifischen pPICZαA Vektor wurde der Hefestamm mit dem Vektor transformiert. Mithilfe der Kolonie-PCR konnten im Anschluss erfolgreich transformierte Hefezellen identifiziert werden. Die nachfolgende Abb. 51 zeigt die amplifizierte DIR 1 und DIR 2 Volllänge.

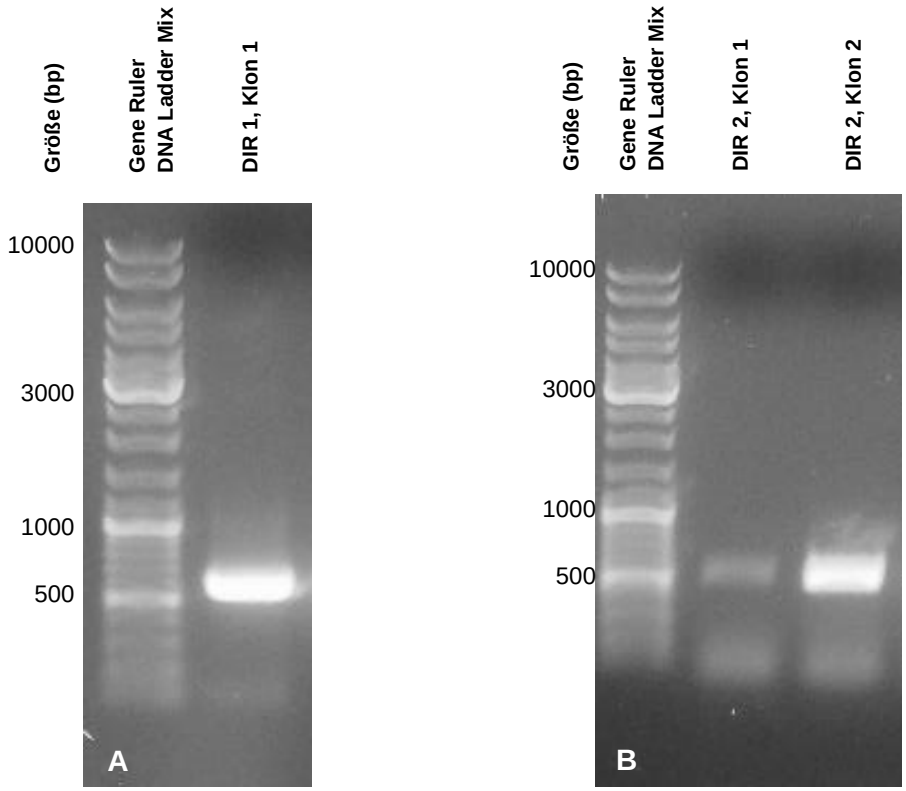


Abb. 51 Kolonie PCR, A: DIR 1 mit 580 bp; B: DIR 2 mit 576 bp

Die Expression von DIR 1 und DIR 2 erfolgte zunächst in kleineren Volumina mit maximal 10 ml Expressionsmedium. Trotz mehrfacher Optimierung der Expressionsbedingungen (Expressionszeit, Anfangszelldichte, Methanolzugabe und Medium) konnte weder für das DIR 1, noch für das DIR 2 eine erfolgreiche Expression verzeichnet werden.

Im nächsten Schritt wurde die Expression zunächst in einem zehnfach höheren Volumen angesetzt. Doch auch hier konnten weder im Medium, noch im aufgeschlossenen Zellmaterial die gewünschten Zielproteine nachgewiesen werden.

Im weiteren Verlauf wurde die Expression im sogenannten „large scale“ Format in einem Liter Medium durchgeführt. Nach dem Abtrennen der Zellen vom Medium wurde dieses über das ÄKTA™ pure System und eine ROTI®Garose-His/Ni HP Kartusche aufgereinigt. Obwohl ein größerer Elutionspeak aufgezeichnet werden konnte, war die anschließende Proteingehaltsbestimmung nach Bradford negativ. Auch über SDS-PAGE und Western Blot konnten keine gewünschten Zielproteine nachgewiesen werden.

V. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mehrere zentrale Schlüsselenzyme aus dem Biosyntheseweg zu Silymarinkomponenten auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene zu charakterisieren, um somit Beiträge zum besseren Verständnis der Biosynthese von Flavonolignanen liefern zu können. Obwohl Silybin das erste beschriebene Flavonolignan ist (Pelter und Hänsel 1968), ist der genaue Biosyntheseweg nach wie vor unklar. Trotz der zahlreichen Artikel, die sich mit den chemischen Eigenschaften und der pharmakologischen Verwendung von Flavanonolderivaten (Silymarin) beschäftigen, wurde bisher nur ein Gen des Stoffwechselwegs identifiziert (CHS, GenBank: JN182806.1) (Torres und Corchete 2016). Nach wie vor sind bis heute nur wenige Gensequenzen der einzelnen Enzyme aus dem Sekundärstoffwechsel der Mariendistel verfügbar (Drouet et al. 2020). Aufgrund dieser begrenzten Informationen ist es schwierig, eine konkrete Aussage über die genauen biosynthetischen und regulatorischen Mechanismen zu treffen.

Im Jahr 2017 gelang es Lv und seinen Mitarbeiter/innen umfangreiche Expressionsprofile von Genen aus der Mariendistel zu erstellen. Bei diesen Genen handelte es sich um alle Enzyme, die – ausgehend von unserem aktuellen Wissensstand – mutmaßlich an der Monolignol- und Flavonoid-Biosynthese beteiligt sind. Unter anderem handelt es sich dabei um die PAL, C4H, 4CL, CCR und CAD aus der Coniferylalkohol Biosynthese und die CHS, CHI und F3H aus der Taxifolin Biosynthese. Hierfür wurden unterschiedliche Gewebeproben aus der Mariendistel (Samenschale/Fruchtwand, Wurzel, Embryo, Stängel, Blatt und Blüte) gewonnen. Die Abbildung 2 aus der Publikation von Lv et al. (2017) zeigt, dass die PAL vornehmlich in den Wurzeln, dem Stängel und den Blättern exprimiert wird. Im Vergleich hierzu werden die CAD und die CCR überwiegend in den Wurzeln und im Stängel exprimiert. Die Expression der CHS ist dagegen in den Blüten und Blättern am stärksten. Im Gegensatz zur PAL, CAD und CCR ist die CHS ebenfalls an der Anthocyan-Biosynthese beteiligt. Anthocyane sind für die Ausbildung der Blütenpigmentierung verantwortlich. Die Genexpressionsanalysen von Lv ergaben zudem eine Überexpression von Dihydrokaempferol 4-Reduktase (DFR, EC: 1.1.1.219) und Leucocyanidin Oxygenase (LDOX, EC: 1.14.11.19) in der Blüte. Diese beiden Enzyme dienen der Synthese von Cyanidin aus Taxifolin. Cyanidin ist eines der häufigsten Pflanzenpigmente und ist verantwortlich für die die rötlich-violette Pigmentierung der Mariendistelblüte (Yuan et al. 2016).

Zusätzlich wurden in der Arbeitsgruppe Konzentrationsbestimmungen von Taxifolin, Coniferylalkohol und Silybin durchgeführt. Während die Enzyme für die Taxifolin-Biosynthese überwiegend in der Blüte exprimiert werden, konnte die höchste Taxifolinkonzentration in der Wand der Achänen verzeichnet werden. Die Enzyme für die Coniferylalkohol-Biosynthese befinden sich ebenfalls überwiegend in der Wand der Achänen, kommen jedoch auch in den übrigen Pflanzenorganen vor. Coniferylalkohol wird in der gesamten Pflanze der Mariendistel

angereichert (Lv et al. 2017). Die *in vivo* Silybin-Biosynthese bei der Mariendistel hängt mit der Entwicklung der Frucht zusammen (Elateeq et al. 2020) und erfolgt unter der Mitwirkung von Peroxidasen, Laccasen und möglicherweise dirigierenden Proteinen (Poppe 2017). Folglich wurde Silybin nur im Embryo und der Samenschale nachgewiesen (Lv et al. 2017).

Basierend auf den Expressionsprofilen und Konzentrationsbestimmungen erstellte die Arbeitsgruppe ein Modell für die Silybin-Biosynthese in der Mariendistel. Dieses vorgeschlagene Modell unterscheidet sich nicht von den bisher bekannten Modellen (z.B. Ferrer et al. 2007 und Kapitel 2 aus der Einleitung) und enthält alle in dieser Arbeit charakterisierten Enzyme.

Während sich beispielsweise die Arbeiten von Lv et al. (2017) oder Torres und Corchete (2016) nur mit Expressionsanalysen und Konzentrationsbestimmungen innerhalb der Mariendistel beschäftigen, konnten im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit Gene der ausgewählten Enzyme (PAL, CHS, CCR und CAD) identifiziert und erfolgreich heterolog exprimiert werden. Mit Ausnahme der CHS konnten die Volllängen der PAL, CAD und CCR erfolgreich aus der RNA eines Pflanzensämlings, bestehend aus Wurzeln, Stängel und wenigen kleinen Blättern gewonnen werden. Die Volllänge der CHS dagegen konnte aus genomischer DNA identifiziert werden. Auch wenn die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse keine direkten Rückschlüsse auf den detaillierten Ablauf der Biosynthesewege erlauben, so konnten durch die biochemische *in vitro* Diagnostik der Proteine wichtige Enzymcharakteristika bestimmt werden. Durch die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur und des idealen pH-Wertes der einzelnen Enzyme konnten nachfolgend nicht nur die katalytischen Effizienzen, sondern auch die Substrataffinitäten und kinetischen Parameter experimentell ermittelt werden. Ein Vergleich der gewonnenen Daten mit bereits dokumentierten Ergebnissen anderer eukaryotischer und/oder prokaryotischer Organismen kann weitere wichtige Erkenntnisse über die Funktionsweise der Enzyme selbst ergeben. In den nachfolgenden Kapiteln werden die einzelnen charakterisierten Enzyme näher diskutiert.

1. Phenylalanin Ammoniak-Lyase

Während die homolog-exprimierte PAL 1 aus der Mariendistel (*Silybum marianum*) über die SDS-Gelelektrophorese eine Molekülgröße von ca. 100 kDa aufwies, zeigte sich bei der PAL 2 eine einzelne Bande mit einer Proteinmasse zwischen 75 und 100 kDa. Beide PAL-Isoformen besitzen jeweils eine errechnete Molekülgröße von 77 kDa.

Viele PAL Enzyme weisen eine native, homotetramere (z.T. auch heterotetramere) Proteinstruktur mit einer Masse zwischen 300 und 340 kDa auf (Hyun et al. 2011). In der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) dagegen wurde eine PAL nachgewiesen, welche aus zwei heterodimeren Einheiten (2x 58 kDa und 2x 68 kDa) besteht (Jorrín et al. 1988). Auch im Pilz *Rhizoctonia solani* konnte eine heterodimere PAL mit 2x 70 kDa und 2x 90 kDa großen

Untereinheiten identifiziert werden (Kalghatgi 1975). Ob die beiden PAL Enzyme aus der Mariendistel ebenfalls eine tetramere native Struktur besitzen, ist derzeit nicht bekannt.
Mehrere Studien an verschiedenen PALs legen nahe, dass dieses Enzym neben Phenylalanin noch weitere Substanzen als Substrate umsetzen kann. Rösler et al. (1997) berichteten bereits, dass einige PAL Enzyme aus Monokotyledonen wie z.B. dem Mais (*Zea mays*) neben Phenylalanin auch Tyrosin enzymatisch umzusetzen können, wohingegen PALs aus Dikotyledonen nur Phenylalanin umsetzen (Jun et al. 2018). Obwohl *Silybum marianum* auch zu den zweikeimblättrigen Pflanzen gezählt wird, weisen beide rekombinant exprimierten PAL-Isoformen eine bifunktionelle Aktivität auf. Neben L- und D-Phenylalanin können beide Enzyme auch L-Tyrosin umsetzen. Die relative Tyrosin Ammoniak-Lyase (TAL, EC 4.3.1.26) Aktivität beider PAL-Isoformen liegt jedoch im Vergleich zur enzymatischen Umsetzung von L-Phenylalanin bei weniger als 1 %. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Aminosäure L-Tyrosin für die *in-vitro* Diagnostik nur in 0,5 M Salzsäure gelöst werden kann. Obwohl die Salzsäure nur einen geringen Anteil von maximal $^{1}/_{25}$ am Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug, könnten bereits diese geringen Mengen ausreichen, um die Enzyme teilweise *in vitro* zu denaturieren. Eine analoge Zugabe von Salzsäure zum L-Phenylalanin Reaktionsansatz wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt. Diese, wenn auch deutlich geringere TAL-Aktivität bietet der Pflanze eventuell eine Form der metabolischen Flexibilität. Es besteht die Möglichkeit, dass eine *in vivo* TAL-Aktivität gegebenenfalls höher ausfällt als bei den *in vitro* Versuchen.
Phenylalanin und Tyrosin werden beide im Shikimatweg synthetisiert. Mehrere Faktoren regulieren die Konzentrationen beider Aminosäuren im Zytosol (Rösler et al. 1997). Befindet sich aufgrund einer reduzierten Biosynthese oder einer vermehrten Proteinbiosynthese weniger L-Phenylalanin in der Pflanze, so besteht die Möglichkeit 4-Cumarsäure aus Tyrosin herzustellen. 4-Cumarsäure wird im Phenylpropanstoffwechsel regulär durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) aus dem Produkt der PAL-Reaktion *trans*-Zimtsäure gebildet (Einleitung, Kapitel 2.1). Dieser Syntheseschritt würde durch die TAL übersprungen.

Neben den PALs und TALs gibt es noch eine weitere wichtige Ammoniak-Lyase, die Histidin Ammoniak-Lyase (HAL, EC: 4.3.1.3). Dieses Enzym wurde in Prokaryoten und Eukaryoten nachgewiesen und spielt im Stoffwechsel eine wichtige Rolle für den Histidinabbau (Wu et al. 2014). Untersuchungen und Vergleiche beider Nucleotidsequenzen und Proteinstrukturen lassen die Vermutung aufkommen, dass sich die PALs höchstwahrscheinlich aus den HALs entwickelt haben (Ritter und Schulz 2004). Auch die beiden PAL-Isoformen der Mariendistel besitzen die charakteristische und konservierte Aminosäureabfolge (GTITASGDLVPLSYIA) der Histidin Ammoniak-Lyase-Familie (Wu et al. 2014).
Dennoch ergaben die Untersuchungen, dass weder die PAL 1, noch die PAL 2 aus der

Mariendistel eine messbare Histidin Ammoniak-Lyase-Aktivität besitzen. Beide Enzyme sind offenbar nicht in der Lage, L-Histidin in Gegenwart von Glutathion zu Urocaninsäure umzusetzen. Hierfür kann es zwei verschiedene Gründe geben:

Im Vergleich zu den prokaryotischen HALs sind die eukaryotischen PALs um etwa 20 kDa pro Monomer größer. Ein Teil dieser zusätzlichen Aminosäuren-Domäne befindet sich am *N*-Terminus der Proteine. Sie bildet bei den pflanzlichen Enzymen einen Bogen über das aktive Zentrum. Dieser Bogen dient möglicherweise als Abschirmdomäne und kontrolliert bzw. beschränkt den Ein- und Austritt von Substraten und Produkten (Ritter und Schulz 2004). Möglicherweise wird durch diese Kontrollfunktion das aktive Zentrum der PALs so abgeschirmt, dass Histidin nicht binden kann. Auch die beiden PAL-Isoformen aus der Mariendistel besitzen zwei Sequenzabschnitte, die möglicherweise für die Ausbildung einer Abschirmung verantwortlich sind (Jun et al. 2018).

Ein weiterer Grund liegt vermutlich in der unterschiedlichen internen Proteinstruktur. Aktuell ist nur eine Histidin Ammoniak-Lyase Kristallstruktur eines Bakteriums (*Pseudomonas putida*) bekannt. Dieses Enzym besitzt im aktiven Zentrum 12 konservierte Aminosäuren Tyr53, Phe59, Leu79, His83, Leu146, Leu191, Asn195, Gln277, Tyr280, Arg283, Asn313, Glu414) (Schwede et al. 1999), die vermutlich für die enzymatische Umsetzung von Histidin zu Urocaninsäure essentiell sind.

2002 charakterisierte Kyndt mit seiner Arbeitsgruppe eine Tyrosin Ammoniak-Lyase aus dem Bakterium *Rhodobacter capsulatus,* welches eine Struktur- und Sequenzhomologie zur *P. putida* HAL aufwies. Jedoch konnte die TAL kein Histidin als Substrat umsetzen. Eine genauere Betrachtung der Proteinsequenz ergab eine veränderte Sequenz an Positionen 83 (His → Leu) und 414 (Glu → Gln). Der Austausch dieser zwei Aminosäuren ist möglicherweise mit dem Fehlen der Aktivität mit Histidin verbunden.

Ein Vergleich der bakteriellen HAL Proteinsequenz mit beiden PALs aus der Mariendistel ergab eine allgemeine Sequenzhomologie von 30 % (PAL 2) und 31 % (PAL 1). Untersuchungen ergaben eine Sequenzhomologie von pflanzlichen PALs zu mehreren HALs zwischen 19 % und 29 % (Schwede et al. 1999).

Im Jahr 2002 wurden die Datenbankeinträge zur bakteriellen HAL (GI:20149834) durch neue Erkenntnisse ergänzt. Im Rahmen der nachträglichen Aktualisierung wurde die Anzahl der am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren auf insgesamt 20 erweitert. Hierbei handelt es sich um Tyr54, Gly54, Ile55, Thr57, Phe59, Gln76, lle79, Ala143, Ser143, Gly144, Ala187 Lys188 Glu189 Gly190 Leu191, Asn195, Tyr280, Arg283, Asn313 und Ser325. Sowohl die PAL 1 als auch die PAL 2 besitzen an Position 55 (Ile → Val), an Position 187 (Ala → Pro) und an Position 325 (Ser → His) Substitutionen (siehe Anhang II, Kapitel 1).

Inwieweit diese konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum die Substratspezifitäten und

Affinitäten der monokotylen, dikotylen und bakteriellen Enzyme bestimmen, ist aktuell noch nicht genau bekannt (Kyndt et al. 2002). Allerdings könnten auch die substituierten Aminosäuren bei den PALs aus der Mariendistel für das Fehlen der Histidin-Aktivität verantwortlich sein.

Die PAL 1 besitzt ihre höchste spezifische Aktivität (35 mkat kg^{-1}) in Tris-HCl-Puffer bei einem pH-Wert von 8,9. Das pH-Optimum der PAL 2 dagegen ist ein wenig niedriger und liegt bei einem pH-Wert von 8,4. Vergleichbare Ergebnisse konnten für die PALs aus den Cyanobakterien *Anabaena variabilis* (ATCC29413) und *Nostoc punctiforme* (TCC 29133) (Moffitt et al. 2007), der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.) (Jorrín et al. 1988), der Kornblume *Centaurea depressa* (Babaoğlu Aydaş et al. 2016) und dem Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) (Nagai et al. 1988) ermittelt werden.

Das Temperaturoptimum beider PAL Isoformen aus der Mariendistel (*Silybum marianum*) betrug jeweils 60 °C. Mit einem Optimum von 55 °C konnten bei der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L) (Jorrín et al. 1988), dem Mais (*Zea mays* L.) (Rösler et al. 1997) und bei der indischen Lotusblume (*Nelumbo nucifera*) (Wu et al. 2014) ähnliche Ergebnisse nachgewiesen werden. Andere PALs dagegen, wie zum Beispiel aus dem Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) (Nagai et al. 1988) oder der Kornblume (*Centaurea depressa*) (Babaoğlu Aydaş et al. 2016), besitzen ihr Temperaturoptimum bereits bei 35 °C und 37 °C.

Während die PAL 1 aus der Mariendistel für L-Phenylalanin einen K_m-Wert von 12 µM aufweist, zeigte sich bei der PAL 2 ein K_m-Wert von 28 µM (ermittelt aus Michaelis-Menten-Auftragungen). Vergleichbare K_m-Werte konnten nur in der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum* L.) mit 11 µM (Nagai et al. 1988) und in der Petersilie (*Petroselinum crispum* Nym.) mit 15-25 µM (Appert et al. 1994) dokumentiert werden. Deutlich höhere K_m-Werte, mit einer daraus resultierenden geringeren Affinität für L-Phenylalanin, zeigten dagegen die PAL Enzyme aus der Gerste (*Hordeum vulgare*) mit 1700 µM (Koukol und Conn 1961) dem braunen Senf (*Brassica juncea* var. *integrifolia*) mit 1300 µM (Lim et al. 1997) und dem Bakterium *Rhodobacter capsulatus* mit 1277 µM (Kyndt et al. 2002). PALs werden häufig als negativ kooperativ beschrieben (Castro et al. 2020). Allgemein betrachtet handelt es sich dabei um einen allosterischen Effekt. Wie bereits erwähnt, bestehen PALs aus mehreren Untereinheiten und besitzen damit mehrere aktive Zentren. Sie sind somit allosterische Proteine. Durch die Bindung eines Substratmoleküls an einem der aktiven Zentren erfolgt eine Verformung der Proteinstruktur, welche einen Einfluss auf die weiteren aktiven Zentren zur Folge hat (Pahlich 1984). Gewinnt das Enzym dadurch eine erhöhte Reaktivität nennt man dies positive Kooperativität. Wird die Affinität zu weiteren Substratmolekülen jedoch dadurch

gesenkt, nennt man diesen Vorgang negativ kooperativ. Beide Möglichkeiten können aus der Umsatzkinetik abgelesen werden (Adam et al. 2009). Auch die beiden PAL Enzyme aus der Mariendistel besitzen bei L-Phenylalanin möglicherweise eine negative Kooperativität.

Im Gegensatz zur Hirse (*Sorghum bicolor*; Jun et al. 2018) zeigten die PAL 1 und 2 aus der Mariendistel eine zusätzliche Affinität zur Aminosäure D-Phenylalanin. Für die PAL 1 konnte ein K_m-Wert von 189 µM bestimmt werden. Bei der PAL 2 betrug der K_m-Wert 177 µM (ermittelt aus Michaelis-Menten-Auftragungen). Diese berechneten Parameter sind im Vergleich zu den K_m-Werten für L-Phenylalanins um den Faktor 16 (PAL 1) und Faktor 7 (PAL 2) höher. Dies kann auf eine deutlich schlechtere Substrataffinität der Enzyme zurückgeführt werden.
Wie bereits in Kapitel 6 der Einleitung beschrieben, bestehen die PAL Enzyme aus mehreren zum Teil identischen Untereinheiten. Sowohl der Mais (*Zea mays*) als auch die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) besitzen vier identische Untereinheiten, aber nachweislich nur zwei aktive Zentren pro Enzymmolekül (Havir und Hanson 1973). An jedes dieser Zentren kann ein L-Substratmolekül binden. Durch die Bindung der Moleküle findet keine gegenseitige Beeinträchtigung statt. Im Gegensatz hierzu führt die Bindung eines D-Moleküls an einem der zwei aktiven Zentren zu einer Konformationsänderung der jeweiligen Untereinheit. Infolgedessen kann das Enzym keinen weiteren Enzym-Substrat-Komplex mit einem weiteren D-Molekül im zweiten aktiven Zentrum mehr eingehen (Nari et al. 1974). Die Kristallstruktur sowie die Anzahl der aktiven Zentren beider PAL Enzyme aus der Mariendistel sind nicht bekannt, jedoch ist möglicherweise die beschriebene Konformationsänderung für die schlechtere Affinität zum D-Substrat verantwortlich. Ein Vergleich der ermittelten K_m-Werte mit weiteren Literaturwerten war leider nicht möglich, da D-Phenylalanin in erster Linie für inhibitorische Studien eingesetzt wurde (Jorrín et al. 1987, Hanson 1981).
Bei der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante mit L-Tyrosin traten bei den Messreihen zwei wesentliche Schwierigkeiten auf, die eine zuverlässige Aussage über die Affinität und Substrataffinität von PAL 1 und PAL 2 ungenau machten. Wie bereits erwähnt, konnte die Aminosäure nur in 0,5 M Salzsäure gelöst werden. Auch wenn die Gesamtmenge der Salzsäure im Reaktionsansatz so gering wie möglich gehalten wurde, kann eine Teildenaturierung der Enzymmoleküle und eine Absenkung des pH-Werts nicht ausgeschlossen werden. Ein weiteres Problem lag in der fehlenden Substratsättigung bei einer zunehmenden L-Tyrosin Konzentration. Des Weiteren führten Konzentrationen von über 6 mM im Reaktionsansatz zu einer unbekannten, nicht-reversiblen Präzipitation einer der Komponenten.
Dennoch konnte mit Hilfe der Cornish-Bowden-Methode ein K_m-Wert von 2,6 mM für die PAL 1 und ein K_m-Wert von 2,4 mM für die PAL 2 ermittelt werden. Ähnliche K_m-Werte von 2,6-7,8 mM konnten bei den PAL-Isoformen aus der Petersilie (Appert et al. 1994) bestimmt werden. Auch

die PAL aus der Indischen Lotusblüte zeigte für das L-Tyrosin einen K_m-Wert von 3,43 mM (Wu et al. 2014).

2. Cinnamoyl-CoA Reduktase

Die CCR aus der Mariendistel besitzt eine errechnete Molekülmasse von 37,1 kDa. Über die denaturierende SDS-Gelelektrophorese zeigte sich beim heterolog-exprimierten Enzym eine einzelne dicke Proteinbande bei einem Molekulargewicht zwischen 35 kDa und 48 kDa. Ähnliche Proteingrößen zwischen 33,5 und 38,3 kDa konnten bei mehreren pflanzlichen CCRs nachgewiesen werden (Chao et al. 2017, Lüderitz und Grisebach 1981, Sonawane et al. 2013). Bei der CCR handelt es sich um ein monomeres Enzym (Goffner et al. 1994) mit stark variierenden Substrataffinitäten zwischen den einzelnen Pflanzenarten. Auch unter den einzelnen CCR-Isoformen derselben Pflanze konnten variierende Affinitäten beobachtet werden. Während die CCR 1 aus dem Schneckenklee (*Medicago truncatula*) Feruloyl-CoA als Hauptsubstrat bevorzugt, zeigt die CCR 2 aus derselben Pflanze eine deutlich höhere Affinität zu Caffeoyl- und 4-Cumaroyl-CoA (Zhou et al. 2010). Auch die zwei charakterisierten CCR Enzyme aus der Rutenhirse (*Panicum virgatum*) zeigten unterschiedliche Substratpräferenzen (Escamilla-Treviño et al. 2010).

Bei der Mariendistel besitzt die CCR ihre höchste enzymatische Aktivität mit Feruloyl-CoA, gefolgt von Sinapoyl-CoA, 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA (relativ zu Feruloyl-CoA mit 52 %, 3 % und 2 %). Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Gartenpetunie (*Petunia* x *hybrida*) beobachtet werden (Pan et al. 2014).

Das pH-Optimum der Mariendistel-CCR liegt bei einem pH von 6,5 und das Temperaturoptimum ist in einem Bereich zwischen 29 °C und 34 °C. Auch zwei CCRs aus der Chinesischen Weißpappel zeigten mit einem pH von 6,0 und einem Temperaturoptimum von 40 °C (Chao et al. 2017) ähnliche Optima. Weitere vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Sojabohne (Wengenmayer et al. 1976), der Weißkopfmimose (*Leucaena leucocephala*) (Sonawane et al. 2013) und der Bastard-Schwarz-Pappel (*Populus euramericana*) (Sarni et al. 1984) ermittelt werden.

Für die Mariendistel-CCR konnten für Feruloyl-CoA mit NADPH (Michaelis-Menten-Darstellung) als auch mit NADH (Cornish-Bowden-Auswertung) als Cosubstrat ein K_m-Wert von 15 µM ermittelt werden. Diese identischen Werte legen die Vermutung nahe, dass die Cosubstrate selbst keinen Einfluss auf die Substrataffinität des Hydroxycinnamoyl-CoA-Substrats besitzen. Auch die charakterisierten CCRs aus der Rutenhirse, der Chinesischen Weißpappel und dem Weizen (*Triticum aestivum* L.) besitzen für Feruloyl-CoA ähnliche K_m-Werte zwischen 9,9 µM und 25,4 µM (Escamilla-Treviño et al. 2009, Chao et al. 2017, Ma und Tian 2005).

Zusätzlich wurden die kinetischen Parameter für Sinapoyl-CoA bestimmt. Der K_m-Wert für dieses Substrat mit NADPH als Cosubstrat beträgt 21,3 µM (Michaelis-Menten-Darstellung). Die K_m-Werte für Sinapoyl-CoA aus der Rutenhirse liegen hier mit Werten von 54,8 und 56,5 µM jedoch etwa 2,5-fach so hoch (Escamilla-Treviño et al. 2009). Auch der K_m-Wert bei der Gartenpetunie liegt mit 270 µM (Pan et al. 2014) deutlich über dem Wert der Mariendistel-CCR. Obwohl die K_m-Werte für Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA bei der Mariendistel vergleichsweise niedrig sind, zeigt sich bei näherer Betrachtung der katalytischen Effizienzen (Differenz aus K_{cat}/K_m-Wert) eine eindeutige Präferenz zum Feruloyl-CoA. Für das Feruloyl-CoA konnte eine katalytische Effizienz von 10600 s^{-1} mol^{-1} ermittelt werden. Im Vergleich dazu, wurde für das Sinapoyl-CoA ein Wert von 1932 s^{-1} mol^{-1} ermittelt. Je höher die Werte sind, desto höher ist die katalytische Effizienz mit diesem Substrat.

Während sich die K_m-Werte der beiden Hauptsubstrate Feruloyl- und Sinapoyl-CoA sehr ähneln, zeigen sich zwischen den K_m-Werten der Cosubstrate (NADH und NADPH) bei der Mariendistel-CCR deutliche Unterschiede. Während NADPH einen niedrigen K_m-Wert von 23 µM besitzt, zeigt sich bei NADH ein um den Faktor 3 höherer K_m-Wert von 68 µM. Obwohl das Enzym in der Nähe des aktiven Zentrums zwei konservierte Aminosäure Abschnitte besitzt, die neben NADPH auch NADH binden können (Chao et al. 2017) lassen diese Ergebnisse auf eine deutliche Präferenz des Enzyms für das NADPH schließen.

Auch die CCR aus der Sojabohne (*Glycine max*) besitzt einen niedrigen K_m-Wert von 28 µM für das Cosubstrat NADPH und akzeptiert darüber hinaus NADH als Cosubstrat. Jedoch beträgt die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit bei NADH nur etwa 5 % der ermittelten Geschwindigkeit mit NADPH. Ein K_m-Wert mit NADH wurde nicht bestimmt (Wengenmayer et al. 1976). Ein weiterer niedriger K_m-Wert für NADPH (6,5 µM) konnte bei der Sorghumhirse (*Sorghum bicolor*) nachgewiesen werden. Eine Bestimmung des K_m-Wertes für NADH war jedoch nicht möglich, da keine enzymatische Aktivität nachweisbar war (Sattler et al. 2017).

3. Coniferylalkohol Dehydrogenase

Die berechnete Molekülgröße der Mariendistel-CAD beträgt 38 kDa. Denaturierende SDS-Gelelektrophorese zeigte eine Größe von etwa 40 kDa. Vergleichbare Proteingrößen von 37,7 und 38,5 kDa konnten bei zwei CADs aus der Zweijährigen Zwenke (*Brachypodium distachyon*) nachgewiesen werden (Bukh et al. 2012). Auch die 12 charakterisierten CAD-Isoformen aus dem Reis (*Oryza sativa* L.) besitzen eine Molekülgröße zwischen 35,0 und 45,9 kDa (Park 2018).

Die Coniferylalkohol Dehydrogenasen sind in der Lage sowohl die Hinreaktion von Coniferaldehyd zu Coniferylalkohol, als auch die Rückreaktion (Coniferylalkohol zu Coniferaldehyd) zu katalysieren (Li et al. 2012). Alle enzymatischen Aktivitätsbestimmungen bei der Mariendistel-CAD wurden mit Coniferylalkohol als Substrat durchgeführt.

Das pH-Optimum der Mariendistel-CAD liegt bei einem pH von 9,1. Ein ähnliches Optimum mit pH-Werten von 8,0 und 9,5 besitzen die zwei CADs der Zweijährigen Zwenke (Bukh et al. 2012). Auch bei der Weihrauch-Kiefer (*Pinus taeda* L.) wurde ein pH-Optimum von 8,8 ermittelt (O'Malley et al. 1992).

Interessanterweise liegen die Temperatur- und pH-Optima bei mehreren charakterisierten Pflanzen-CADs mit Coniferaldehyd als Substrat deutlich niedriger. Zum Beispiel liegen die pH-Optima beider Lebermoos-CADs (*Plagiochasma appendiculatum*) bei pH-Werten von 5,5 und 6,0. Die Temperaturoptima liegen bei 25 °C und 30 °C (Sun et al. 2013). Auch bei der CAD aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) konnte ein Temperaturoptimum von 30 °C nachgewiesen werden. Die CAD aus der Mariendistel dagegen besitzt ihr Temperaturoptimum bei 55 °C.

Dieses deutlich höhere Temperaturoptimum bei der Mariendistel-CAD hängt möglicherweise mit der Durchführung des Enzymtests selbst zusammen. Während bei den Lebermoos-CADs die Reaktionszeit 30 min betrug, wurde bei der Mariendistel-CAD die Reaktionszeit auf 5 min festgelegt. Infolgedessen war die Mariendistel-CAD den jeweiligen Temperaturen zeitlich gesehen deutlich weniger ausgesetzt. Dies hatte möglicherweise eine spätere Inaktivierung bzw. Denaturierung des Enzyms bei den höheren Temperaturen zur Folge. In beiden Fällen wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe des Enzyms gestartet.

Der K_m-Wert für das Substrat Coniferylalkohol beträgt bei der Mariendistel-CAD 25 µM (Michaelis-Menten-Darstellung). Für das Cosubstrat $NADP^+$ konnte über die Michaelis-Menten-Darstellung ein K_m-Wert von 3,2 µM ermittelt werden. Vergleiche mit entsprechenden Literaturwerten ist leider nicht möglich, da die kinetischen Parameter bei den bereits genannten Pflanzen nur mit Coniferaldehyd und NADPH bestimmt wurden.

4. Chalkonsynthase

Chalkonsynthasen sind Proteine, die ein Homodimer (2x 43 kDa) bilden und infolgedessen zwei aktive Zentren besitzen (Austin und Noel 2002, Sun et al. 2015). Jedes aktive Zentrum wird durch die Aminosäurereste Cystein, Histidin und Asparagin definiert (Ferrer et al. 1999). Die Chalkonsynthase aus der Mariendistel besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 45 kDa. Das heterolog exprimierte Enzym zeigte bei der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese eine einzelne Proteinbande von einer Größe zwischen 63 und 75 kDa.

Ob dieses Enzym in seiner aktiven Form jedoch als Dimer vorliegt, ist nicht bekannt. Ähnliche Monomer-Proteingrößen von 43 kDa konnten unter anderem im Senf (*Sinapis alba*) (Tropf 1995) und im Apfel (*Malus* x *domestica* Borkh) (Yahyaa et al. 2017) nachgewiesen werden.

Die CHS aus der Mariendistel besitzt für 4-Cumaroyl-CoA einen K_m-Wert von 1,48 µM. Dieser Wert ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Petersilie (*Petroselinum hortense*) mit 2,6 µM (Hrazdina 1976), im Senf (*Sinapis alba*) mit 2,3 µM (Tropf 1995) und dem Echten

Mehltau mit 2 µM (Christensen et al. 1998). Für das zweite Substrat, Malonyl-CoA, konnte bei der Mariendistel-CHS ein K_m-Wert von 12 µM bestimmt werden. Dieser um den Faktor 8 höhere K_m-Wert bei Malonyl-CoA weist darauf hin, dass das 4-Cumaroyl-CoA bei der CHS möglicherweise zuerst an eines der aktiven Zentren gebunden wird. Diese Bindungsreihenfolge konnte durch mehrere Strukturanalysen bestätigt werden (Ferrer et al. 1999).

Im Gegensatz zu den K_m-Werten aus der Mariendistel, zeigen die Chalkonsynthasen aus anderen Organismen eine höhere Affinität zum Malonyl-CoA. Beim Apfel konnte für das Malonyl-CoA ein K_m-Wert von 0,75 µM und für das 4-Cumaroyl-CoA von 5,1 µM bestimmt werden (Yahyaa et al. 2017). Auch im Blasenmützenmoos konnte für Malonyl-CoA ein geringerer K_m-Wert von 3,5 µM ermittelt werden. Der K_m-Wert für 4-Cumaroyl-CoA betrug 48 µM (Jiang et al. 2006). Warum beide Chalkonsynthasen eine größere Affinität zum Malonyl-CoA aufweisen ist unklar. Die CHS gehören zu den am weitesten verbreiteten Typ-III Polyketidsynthasen in höheren Pflanzen. Die meisten der bisher charakterisierten CHS-ähnlichen Enzyme in Pflanzen sind wahrscheinlich durch umfangreiche Duplikationen mit daraus resultierenden Sequenzmutationen und -substitutionen entstanden (Austin und Noel 2003).
Diese CHS-ähnlichen Enzyme, zu denen möglicherweise auch die genannten CHS aus dem Blasenmützenmoos und dem Apfel gehören, können sich unter anderem von den klassischen CHS durch ihre Vorliebe für Startermoleküle und deren Bindungsreihenfolge unterscheiden. Diese mutierten, divergenten CHS-ähnlichen Enzyme besitzen enzymatische Aktivitäten mit funktionellen Redundanzen, die jedoch die Flavonoid-Biosynthese nicht gefährden (Dare et al. 2013).
Während bei der CHS aus der Mariendistel keine katalytische Aktivität mit Caffeoyl-CoA als Substrat nachgewiesen werden konnte, konnte bei der CHS aus dem Roggen (*Secale cereale* L.) ein K_m-Wert von 1,45 µM für Caffeoyl-CoA ermittelt werden (Peters et al. 1988). Auch die rekombinant exprimierten CHSs aus der Färberdistel (*Carthamus tinctorius*) akzeptierten Caffeoyl-CoA als Substrat (Shinozaki et al 2016). Nähere Informationen bezüglich der Spezifität sind nicht bekannt. Auch die CHS aus *Tulipa* und *Cosmos sulphureus* akzeptierten Caffeoyl-CoA als Substrat. Jedoch zeigten die Messergebnisse eine deutlich höhere Affinität zu 4-Cumaroyl-CoA (Sütfeld und Wiermann 1980). 1977 analysierte die Arbeitsgruppe um Saleh in ihrer Arbeit eine Flavanonsynthase, welche sowohl Naringenin aus 4-Cumaroyl-CoA mit Malonyl-CoA, als auch Eriodictyol aus Caffeoyl-CoA mit Malonyl-CoA synthetisieren konnte. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass diese Synthesen pH-abhängig sind. Die Synthese von Naringenin erfolgte zwischen pH-Werten von 6,0 und 9,0 mit einem Optimum bei pH 8,0. Die Eriodictyol-Synthese dagegen erfolgte bei pH-Werten zwischen 5,0

und 8,0, jedoch mit einem deutlich niedrigeren Optimum zwischen pH 6,5 und 7,0. Inwieweit die CHS aus der Mariendistel möglicherweise bei einem niedrigeren pH-Wert doch Eriodictyol aus Caffeoyl-CoA und Malonyl-CoA synthetisieren könnte, ist unklar. Da in dieser Arbeit jedoch auch längere Reaktionszeiten von bis zu 3 Stunden ausgetestet wurden und diese ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis führten, scheint dies eher unwahrscheinlich.

Die CHS der Mariendistel besitzt ihr pH-Optimum in einem Tris/HCl-Puffer bei einem pH von 7,7. Das Temperaturoptimum konnte bei 40 °C bestimmt werden. Auch die CHS aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* besitzt ihr Temperaturoptimum bei 40 °C. Das pH-Optimum konnte bei einem pH von 8,0 bestimmt werden (Whitehead und Dixon 1983). Ein ähnliches pH-Optimum konnte beim Apfel (*Malus* x *domestica* Brokh.) mit einem pH von 7 ermittelt werden. Das Temperaturoptimum wurde bei 30 °C bestimmt (Yahyaa et al. 2017). Für die isolierte CHS aus dem Roggen konnte ein pH-Optimum bei pH 8 ermittelt werden (Peters et al. 1988). Auch die CHS aus dem Lebermoos *Plagiochasma appendiculatum* zeigte ein ähnliches pH-Optimum bei einem Wert von pH 7,4 und ein Temperaturoptimum bei 35 °C (Yu et al. 2014).
Aktuell liegen weitere Forschungsinteressen in einer Überexpression von CHS-Genen und den daraus resultierenden, phänotypischen Veränderungen der Pflanzen (El-Garhy et al. 2016, Liu et al. 2021, Pang et al. 2005).

5. Peroxidase

Die Peroxidase (POD) aus der Mariendistel besitzt eine errechnete Molekülgröße von 32 kDa. Im Rahmen seiner Arbeit konnte Dr. Poppe die Peroxidase in InvSc1 Hefezellen exprimieren, jedoch wies das Enzym keine katalytische Aktivität auf. Aufgrund der *N*-Glykosylierung des Proteins schwanke seine (Glyko-)Proteinmasse zwischen 35 kDa und 65 kDa (Poppe 2017). Die rekombinante Proteinexpression der in *Physcomitrium patens* exprimierten POD ergab vergleichbare Proteingrößen von 30 kDa und 75 kDa. Leider konnte jedoch keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Trotz mehrfacher Wiederholung und Anpassung des Expressionssystems und der Versuchsprotokolle konnte das Enzym allgemein nur ein einziges Mal heterolog exprimiert werden. Da aufgrund der Glykosylierungen bakterielle Systeme ungeeignet sind und eine Expression in Hefestämmen und pflanzenbasierten Systemen ebenfalls erfolglos blieben, ist die Verwendung von Insektenzelllinien die nächstmögliche Option. Diese Zellen sind ebenfalls auf die Expression von sezernierten Proteinen spezialisiert. Jedoch sollte an dieser Stelle bedacht werden, dass für die Forschung mit Insektenzelllinien ein Sicherheitsstufe 2 Labor erforderlich ist.

6. Dirigierende Proteine

Dirigierende Proteine weisen, ähnlich zu den Peroxidasen, mehrere *N*-Glykosylierungen auf (Pickel et al. 2012). Die zwei dirigierenden Proteine aus der Mariendistel besitzen eine errechnete Größe von jeweils 19 kDa. Das homolog-exprimierte dirigierende Protein 2 aus der Mariendistel besitzt über die SDS-Gelelektrophorese eine denaturierte Proteingröße zwischen 25 kDa und 27 kDa (Poppe 2017).

Nachdem die rekombinante Proteinexpression von DIR 1 und DIR 2 im Blasenmützenmoos (*Physcomitrium patens*) nicht erfolgreich war, wurde eine Proteinexpression im Hefestamm SuperMan5-20 GlycoSwitch® *Pichia* angestrebt. Dieser Stamm verhindert die Ausbildung von Hypermannosylierungen und wurde bereits erfolgreich für die rekombinante Expression von DIRs aus der Baumwolle eingesetzt (Effenberger et al. 2017). Trotz mehrfacher Anpassung des Expressionsprotokolls (angelehnt an Jacobs et al. 2018) war leider eine rekombinante Expression der beiden dirigierenden Proteine aus der Mariendistel erfolglos.

Zusammenfassend blieb die rekombinante Expression der beiden dirigierenden Proteine analog zur Peroxidase mit den eingesetzten Systemen erfolglos. Auch hier würde sich die Verwendung von Insektenzelllinien anbieten.

7. Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte ein proteinbiochemisches Profil von vier der sechs ausgewählten Enzyme angefertigt werden. Die unter anderem erstellten Substrataffinitätsprofile der jeweiligen Enzyme erlauben zudem vereinfachte Rückschlüsse auf einzelne Abschnitte der Flavonolignan-Biosynthese.

Beide Phenylalanin Ammoniak-Lyasen aus der Mariendistel zeigten ihre höchste enzymatische Affinität gegenüber dem L-Phenylalanin und wandeln die Aminosäure zur *trans*-Zimtsäure um. Darüber hinaus sind die beiden Enzyme ebenfalls in der Lage, L-Tyrosin zu 4-Cumarsäure umzusetzen. 4-Cumarsäure wird im Phenylpropanstoffwechsel regulär durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) aus der *trans*-Zimtsäure gebildet werden. Dieser Syntheseschritt kann in der Mariendistel in geringfügigem Maße durch die beiden PALs übersprungen werden (Einleitung Kapitel 2.1, Abb. 6). Es ist allerdings anzunehmen, dass dies *in vivo* keine maßgebliche Rolle spielt.

Die Cinnamoyl-CoA Reduktase ist Teil der Monolignol-Biosynthese und wandelt Feruloyl-CoA in Coniferaldehyd um (Chao et al. 2017). Auch die Mariendistel-CCR zeigte eine eindeutige Präferenz für das Feruloyl-CoA als Hauptsubstrat. Ferner ist das Enzym in der Lage, Sinapoyl-CoA, 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA enzymatisch umzusetzen. Dies ermöglicht dem Enzym eine gewisse Substratflexibilität (Abb. 52). Darüber hinaus akzeptierte die Mariendistel-CCR sowohl NADPH als auch NADH als Kofaktor. Auch wenn die ermittelten K_m-Werte für beide Kofaktoren identisch sind, so läuft die enzymatische Reaktion mit NADH als Kofaktor

um den Faktor 10 langsamer ab.

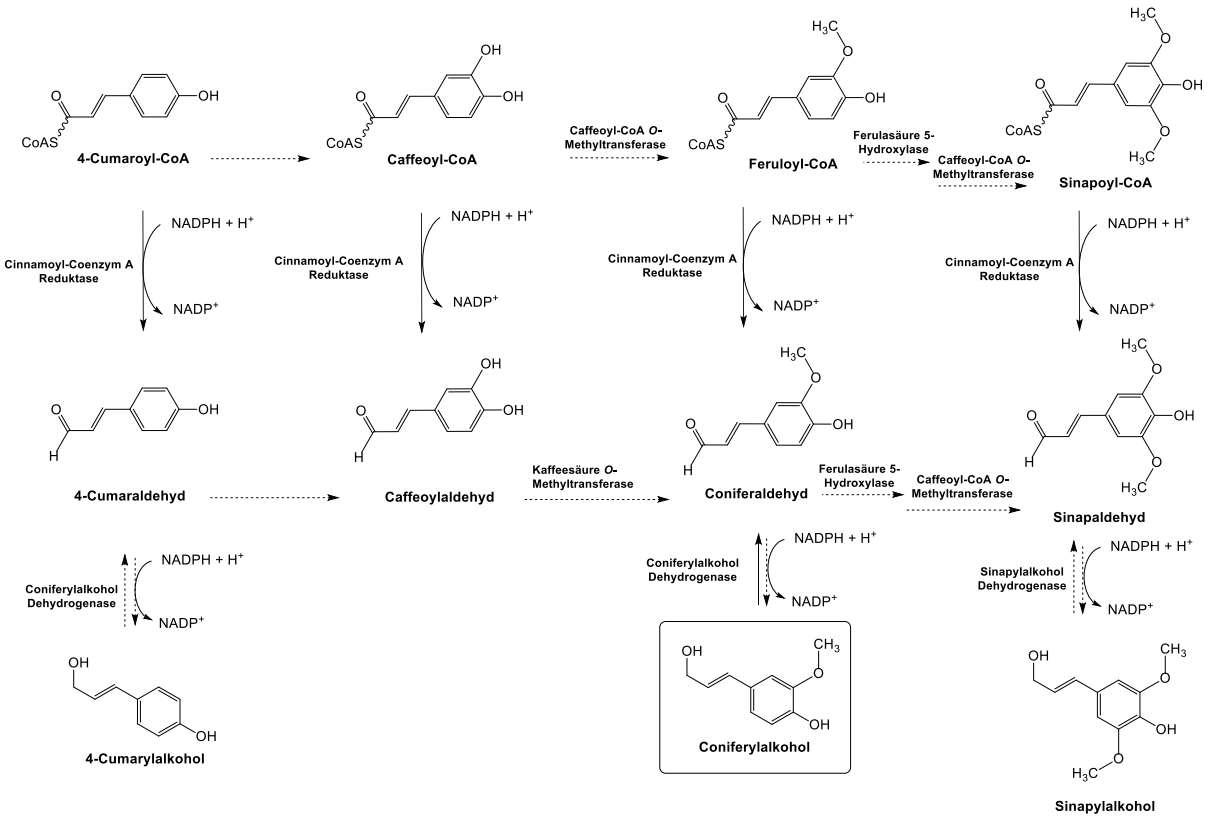


Abb. 52: Enzymatische Umsetzungsmöglichkeiten der CCR und der CAD aus der Mariendistel. Die grünen Pfeile zeigen die in dieser Arbeit bestätigten enzymatischen Umsetzungsreaktionen. Gestrichelte Linien zeigen mögliche weitere Reaktionen in Anlehnung an Hamada et al. (2004).

Im letzten Schritt der Monolignol-Biosynthese bildet die Coniferylalkohol Dehydrogenase mit $NADPH_2$ aus dem Coniferaldehyd den Coniferylalkohol. Dieses Enzym kann sowohl die beschriebene Hinreaktion, als auch die Rückreaktion (Coniferylalkohol zu Coniferaldehyd) katalysieren (Li et al. 2012) (Einleitung, Kapitel 2.2). Diese enzymatische Rückreaktion konnte mit der Mariendistel-CAD bestätigt werden. Weitere Substrate wurden nicht getestet.

Die Chalkonsynthase ist Teil des Flavonoid-Biosyntheseweges und bildet aus 4-Cumaroyl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA das Naringenin-Chalkon. Bei der Mariendistel-CHS konnte im Rahmen der HPLC-Analysen zwar kein Naringenin-Chalkon als Produkt nachgewiesen werden, jedoch Naringenin. Das Naringenin wird entweder spontan oder mithilfe der Chalkonisomerase (CHI) aus Naringenin-Chalkon gebildet (Ferrer et al. 2007). Ob das Naringenin direkt durch die Mariendistel-CHS gebildet wird, oder durch die spontane Zyklisierung, ist nicht näher bekannt. Die charakterisierte Mariendistel-CHS akzeptiert keine weiteren Substrate und ist somit nicht in der Lage, Eriodictyol aus Caffeoyl-CoA und Malonyl-CoA zu synthetisieren (siehe Abb. 53).

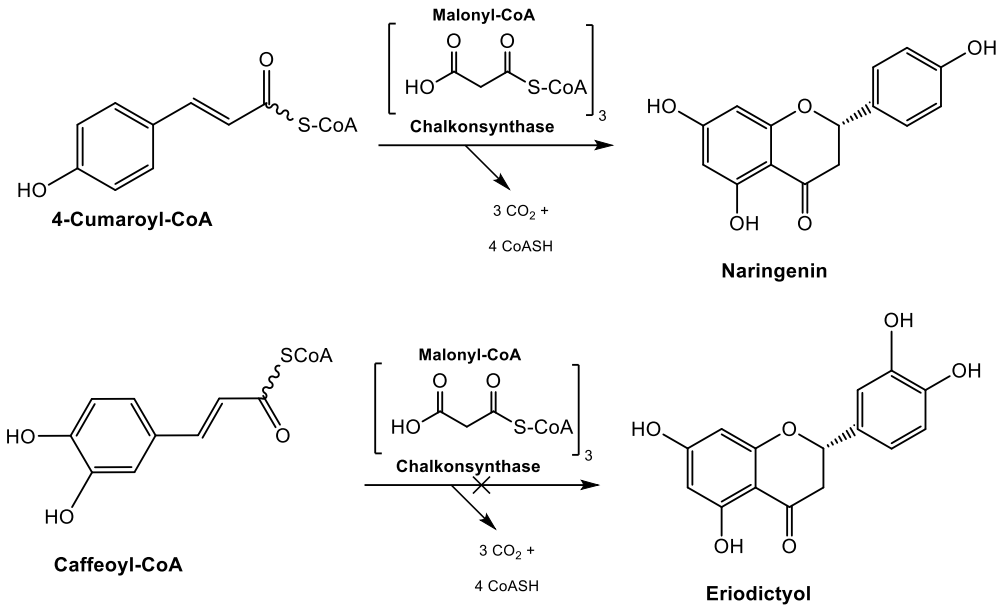


Abb. 53 Enzymatische Umsetzungsmöglichkeiten der CHS. Im Rahmen der HPLC-Auswertung konnte nur Naringenin nachgewiesen werden. Die Mariendistel-CHS ist nicht in der Lage, Eriodictyol zu bilden.

Die enzymatische Charakterisierung der Peroxidase und der zwei dirigierenden Proteine war leider aufgrund der gescheiterten heterologen Expression nicht durchführbar. Aufgrund des fehlenden proteinbiochemischen- und Substrataffinitätsprofiles ist es schwierig, Rückschlüsse über die Beteiligung der Enzyme an der Flavonolignan Biosynthese zu treffen.

Zusammenfassend besitzen alle erläuterten Enzyme ihre höchste Substrataffinität zu den postulierten Substraten der Phenylpropan-, Flavonoid- und Monolignol-Biosynthese (Ferrer et al. 2007) in der Mariendistel.

8. Ausblick

Trotz des umfangreichen Datenmaterials, welches gesammelt werden konnte, sind nach wie vor einige Fragen offen.

Obwohl die Mariendistel drei CHS-Isoformen besitzen soll (GI: 388542656; GI: 388542654; GI: 391874847), konnte im Rahmen dieser Arbeit nur ein Enzym amplifiziert, heterolog exprimiert und biochemisch charakterisiert werden. Hinweise auf weitere CHS-Isoformen konnten bei den molekularbiologischen Experimenten nicht gefunden werden. Eine erneute und genauere computergestützte Sequenz- und Datenbank-Analyse bietet hier möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt für die Herstellung von sequenzspezifischen Oligonukleotiden. Eine anschließende Amplifikation und Identifikation der Volllängen, eine Expression sowie eine anschließende biochemische Charakterisierung bieten möglicherweise weitere Erkenntnisse über die Chalkonsynthasen aus der Mariendistel und ihre Beteiligung an der Flavonolignan Biosynthese.

Die Enzyme Cinnamoyl-CoA Reduktase und Coniferylalkohol Dehydrogenase sind innerhalb des Monolignol-Biosyntheseweges direkt hintereinander geschaltet (Lv et al. 2017, Ferrer et al. 2007). Die Mariendistel-CCR zeigte mehrere Substrataffinitäten, zu denen unter anderem auch das Sinapoyl-CoA gehört. Das entstehende Produkt (Sinapaldehyd) bildet hierbei das Substrat für die sogenannten Sinapylalkohol Dehydrogenasen (SAD). Diese Enzyme gehören zur selben Enzymklasse wie die CADs und sind ebenfalls in der Lignin-Biosynthese involviert (Ferrer et al. 2007). Obwohl SADs und CADs die gleiche Reaktion katalysieren, so unterscheidet sich die Topologie beider aktiver Zentren voneinander (Bomati und Noel 2005). An dieser Stelle wäre es interessant, inwieweit sich die in dieser Arbeit charakterisierte CAD von einer möglichen SAD aus der Mariendistel sowohl strukturell als auch biochemisch unterscheidet.

VI. Zusammenfassung

Aufgrund ihrer Inhaltsstoffe ist die Mariendistel (*Silybum marianum*) besonders für die medizinische Therapie von Bedeutung (Valková 2020). Die Früchte und Extrakte dieser Pflanze werden bereits seit über 2000 Jahren für die Behandlung von Leber- und Gallenwegserkrankungen verwendet (Delmas et al. 2020). Darüber hinaus zeigt die Hauptwirksubstanz Silymarin eine natürliche antiinflammatorische Aktivität (Corchete 2008) sowie ein hemmendes Potential gegen verschiedene Krebsarten (Won et al. 2018). Silymarin ist ein Flavanonollignan-Gemisch aus mehreren Regioisomeren und Diastereomeren. Sie werden durch oxidative Kopplung einer Flavonoid- (Taxifolin) und einer Phenylpropanoid-Einheit (Coniferylalkohol) gebildet. Bei der Reaktion handelt es sich vermutlich um eine radikalische Kopplung (Bernards 2010), die zunächst eine Radikalbildung erfordert, welche möglicherweise durch eine Laccase oder eine Peroxidase (POD) katalysiert wird (Poppe und Petersen 2016, Bijak 2017). Danach könnten dirigierende Proteine (DIR) die regio- und stereospezifische Kopplung, die zur Bildung der einzelnen Regioisomere und Diastereomere führt, vermitteln (Pickel und Schaller 2013).

Die Biosynthese beider Vorläufereinheiten erfolgt mit Hilfe mehrerer Enzyme des Phenolstoffwechsels. Die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) ist hierbei das erste zentrale Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Phenylpropanen und katalysiert eine nicht oxidative Desaminierung des Phenylalanins zu *trans*-Zimtsäure. Die Chalkonsynthase (CHS) ist ein wichtiges Enzym im Flavonoid-Biosyntheseweg und synthetisiert Naringenin-Chalkon, welches über weitere Reaktionsschritte zu Taxifolin umgewandelt wird. Die Cinnamoyl-CoA-Reduktase (CCR) ist das erste Enzym welches Phenylpropanoid-Metabolite in den Monolignol-Weg leitet. Es katalysiert die Umwandlung von 4-Cumaroyl-, Feruloyl- und Sinapoyl-CoA mit Hilfe von NADPH zu 4-Cumaraldehyd, Coniferaldehyd und Sinapaldehyd. Im letzten Schritt des Monolignol-Biosyntheseweges bildet die Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD) in Abhängigkeit von NADPH aus Coniferaldehyd Coniferylalkohol. Diese Enzyme sowie der Kopplungsmechanismus selbst sind in der Mariendistel (*Silybum marianum*) bisher noch nicht untersucht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die sekretorische Klasse III Peroxidase, sowie zwei dirigierende Proteine aus der Mariendistel heterolog exprimiert werden. Aufgrund der verstärkten Anwesenheit von Signalpeptiden und mehreren Glykosylierungsstellen, konnte trotz mehrfacher Methodenoptimierung keine erfolgreiche Expression der Gene verzeichnet werden. Im Gegensatz hierzu konnten jedoch PAL, CHS, CCR und CAD erfolgreich in *Escherichia coli* heterolog exprimiert werden.

Die Mariendistel besitzt zwei PAL-Isoformen mit einer Molekülmasse zwischen 75 und 100 kDa. Proteinbiochemische Charakterisierungen ergaben Affinitäten zu L- und D-Phenylalanin und L-Tyrosin. Beide PALs besitzen ein Temperaturoptimum von 60 °C und ein pH-Optimum von 8,5 und 9,5. Für L-Phenylalanin konnten K_m-Werte von 12 und 35,2 µM, für D-Phenylalanin von 146 und 236 µM und für L-Tyrosin von 2,4 und 2,6 mM ermittelt werden. Die CHS dagegen besitzt eine Proteinmasse zwischen 63 und 75 kDa. Das Enzym hat sein pH-Optimum bei pH 7,7. Das Temperaturoptimum konnte auf 40 °C bestimmt werden. Für 4-Cumaroyl-CoA konnte ein K_m-Wert von 1,48 µM und für Malonyl-CoA ein K_m-Wert von 12 µM bestimmt werden.
Ein weiteres in dieser Arbeit charakterisiertes Enzym ist die CAD. Über die Gelelektrophorese konnte eine Proteinmasse von etwa 40 kDa ermittelt werden. Proteinbiochemische Charakterisierungen ergaben ein pH-Optimum bei pH 9,1. Das Temperaturoptimum konnte auf 55 °C bestimmt werden. Der K_m-Wert für Coniferylalkohol beträgt 25 µM und für das Cosubstrat (NADP) 3,2 µM.
Als letztes der charakterisierten Enzyme ist die CCR zu nennen. Dieses monomere Enzym besitzt ein Molekulargewicht zwischen 35 kDa und 48 kDa und akzeptiert mehrere Substrate: Feruloyl-CoA, gefolgt von Sinapoyl-CoA, 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA. Das pH-Optimum konnte auf pH 6,5 und das Temperaturoptimum auf einen Bereich zwischen 29 °C und 34 °C festgelegt werden. Der K_m-Wert für Feruloyl-CoA liegt bei 15 µM, für Sinapoyl-CoA bei 21,3 µM, für NADPH bei 23 µM und für NADH bei 68 µM.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit mehrere Schlüsselenzyme aus dem Phenolstoffwechsel aus *Silybum marianum* identifiziert und heterolog exprimiert werden. Darüber hinaus konnten wichtige Parameter erhoben werden und so tiefere Einblicke und Erkenntnisse in die biochemischen Eigenschaften der ausgewählten Schlüsselenzyme gewonnen werden. Diese Ergebnisse bieten eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen des pflanzlichen Phenylpropanoid-Biosynthesewegs in der Mariendistel.

VII. Summary

Due to its active natural compounds, milk thistle (*Silybum marianum*) is particularly important for medicinal therapy (Valková 2020). Extracts of this plant are commonly used for the treatment of liver and gall bladder disorders for over 2000 years (Delmas et al. 2020). In addition, the main active ingredient silymarin shows natural anti-inflammatory activity (Corchete 2008), as well as potential inhibitory activities on various cancers (Won et al. 2018). Silymarin is a flavanonollignan mixture of several regioisomers and diastereomers. They are formed by oxidative coupling of a flavonoid (taxifolin) and a phenylpropanoid (coniferyl alcohol) moiety. The reaction putatively is a radical coupling (Bernards 2010), which requires radical formation first, possibly catalyzed by a laccase or a peroxidase (POD) (Poppe and Petersen 2016, Bijak 2017). Thereafter, dirigent proteins (DIR) presumably mediate the regiospecific and stereospecific coupling that leads to the formation of the individual regioisomers and diastereomers (Pickel and Schaller 2013).

Biosynthesis of both precursor units takes place with the help of several enzymes of phenolic metabolism. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is the first key enzyme in the biosynthesis of phenylpropanes, catalyzing a non-oxidative deamination of phenylalanine to *trans*-cinnamic acid. Chalcone synthase (CHS) is another important enzyme in the flavonoid biosynthetic pathway, synthesizing naringenin chalcone. Taxifolin is formed via further reaction steps. Cinnamoyl-CoA reductase (CCR) is the first enzyme that directs phenylpropanoid metabolites into the monolignol pathway. It catalyzes the conversion of 4 coumaroyl-, feruloyl and sinapoyl-CoA to 4-coumaraldehyde, coniferaldehyde, and sinapaldehyde with the help of NADPH. After that, coniferylalcohol dehydrogenase (CAD) forms coniferylalcohol using NADPH. These enzymes as well as the coupling mechanism itself have not been studied in milk thistle (*Silybum marianum*) yet.

In this work, it was further more aimed at expressing the secretory class III peroxidase as well as two dirigent proteins from milk thistle. Due to the presence of signal peptides and several glycosylation sites, no successful expression of the genes could be recorded despite of several attempts of method optimization. However, PAL, CHS, CCR and CAD were successfully expressed heterologously in *Escherichia coli*.

Milk thistle contains two PAL isoforms with a molecular mass between 75 and 100 kDa. Protein characterization revealed enzymatic affinities for L- and D-phenylalanine and L-tyrosine. Both PALs show a temperature optimum at 60 °C and a pH optimum at 8.5 and 9.5. K_m-values for L-phenylalanine could be determined at 12 and 35.2 µM. D-phenylalanine had a K_m at 146 µM and 236 µM and L-tyrosine at 2.4 and 2.6 mM.

CHS possesses a protein mass between 63 and 75 kDa. The enzyme shows a pH-optimum at pH 7.7. The temperature optimum could be determined to be 40 °C. 4-Coumaroyl-CoA had a K_m-value of 1.48 µM and malonyl-CoA a K_m of 12 µM.
Additionally, a CAD was characterized in this thesis. A protein mass of approximately 40 kDa could be determined via gel electrophoresis. Protein biochemical characterizations revealed an optimal enzyme reaction at a pH of 9.1 as well as a temperature optimum at 55 °C. K_m-values were pointed out to be at 25 µM for coniferyl alcohol and 3.2 µM for the cofactor NADP.

The last characterized enzyme was CCR. This monomeric enzyme has a molecular weight between 35 kDa and 48 kDa and shows substrate affinity to feruloyl-CoA, followed by sinapoyl-CoA, 4-coumaroyl-CoA and caffeoyl-CoA. The pH-optimum was found out to be at pH 6.5 and the temperature optimum ranged from 29 °C to 34 °C. The K_m-value is 15 µM for feruloyl-CoA, 21.3 µM for sinapoyl-CoA, 23 µM for NADPH and 68 µM for NADH.

In summary, several key enzymes from phenol metabolism were identified and expressed heterologously in this work. In addition, relevant parameters have been obtained, providing important insights and knowledge into the *in vitro* nature of selected key enzymes. These results provide a solid basis for further studies of the plant phenylpropanoid biosynthetic pathway in *Silybum marianum*.

VIII. Anhang II

1. CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment der Aminosäuresequenzen der beiden PAL-Isoformen aus *Silybum marianum* und der HAL aus *Pseudomonas putida*

Grün unterlegte Sequenzbereiche beschreiben das aktive Zentrum der Histidin Ammoniak-Lyase aus *Pseudomonas putida* (pir||A35251, sp|P21310.3). Blau markierte Aminosäuren zeigen die Abweichungen bei den Phenylalanin Ammoniak-Lyasen aus der Mariendistel.

```
PAL 1 S.marianum      MENGNHVNGVAVLNEFCI-KDPLNWGVAAEALTGSHLDEVKKMVAEFRKPVVKLGGETLT
PAL 2 S.marianum      MANNNR----HVATELCINKDPLNWGLAAEAMTGSHLDEVKRMVAEFRKPVVKLGGETLT
HAL P. putida         ------------------------------------------------MTELTLKPGTLT
                                                                        *   ***

PAL 1 S.marianum      VSQVAGIAAANDSNTVKVELSESARAGVKASSDWVMESMRKGTDSYGVTTGFGATSHRRT
PAL 2 S.marianum      VSQVAGIAAAGESSVVTVELSEAARAGVKASSDWVMESMNKGTGSYGVTTGFGATSHRRT
HAL P. putida         LAQLRAIHAA----PVRLQLDASAAPAIDASVACVEQIIAEDRTAYGINTGFGLLASTRI
                        *   * **     *   *   *     **   *          **  ****     *

PAL 1 S.marianum      KQG--GALQKELIRFLNAGIFGNGTESSHTLPHSATRAAMIVRINTLLQGYSGIRFEILE
PAL 2 S.marianum      KQG--GALQKELIRFLNAGIFGNGTESSHTLPHSATRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILE
HAL P. putida         ASHDLENLQRSLVLSHAAGI-------GAPLDDDLVRLIMVLKINSLSRGFSGIRRKVID
                             **  *     ***          *     *  *   ** *  * ****

PAL 1 S.marianum      AITKFLNQNVTPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNSKAVGPTGEILNAEEAFAQ
PAL 2 S.marianum      AITKFLNTNVTPCLPLRGTITASGDLVPLSYIARLLTGRPNSKAVGPTGEILNAEQAFTL
HAL P. putida         ALIALVNAEVYPHIPLKGSVGASGDLAPLATMSLVLLGEGKARY---KGQWLSATEALAV
                      *     *  * *  ** *   ***** **      * *          *  * *  *

PAL 1 S.marianum      AGVEGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANVLALLSEVLSAIFAEVMQGKPEF
PAL 2 S.marianum      AGVSGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANVLALLSEVMSAIFAEVMQGKPEF
HAL P. putida         AGLE--PLTLAAKEGLALLNGTQASTAYALRGLFYAEDLYAAAIACGGLSVEAVLGSRSP
                      **       *  ****** ***      *   ** *  *            *   *

PAL 1 S.marianum      TDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEYILDGSDYVKAAQKVHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWL
PAL 2 S.marianum      TDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEYILDGGDYVKAAQKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWL
HAL P. putida         FDARIHEARGQRGQIDTAACFRDLLGDSSEVSLSHK--NCDKV----QDPYSLRCQPQVM
                       *   *      ***  **     *     *    *    *      ** * **  **

PAL 1 S.marianum      GPQIEVIRSATKMIEREINSVKDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMDNTRLAIAAIG
PAL 2 S.marianum      GPHXEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVARNKALHGGNFQGTPIGVSMDNTRLAIASIG
HAL P. putida         GACLTQLRQAAEVLGIEANAVSDNPLVFAAEGDVISGGNFHAEPVAMAADNLALAIAEIG
                      *      *        * * * ****          ****   *     **  **** **

PAL 1 S.marianum      KLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFEGGEIAMASYCSELQFLANPVTNHV
PAL 2 S.marianum      KLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHV
HAL P. putida         SLSERRISLMMDKHMS-QLPPFLV--ENGGVNSGFMIAQVTAAALASENKALSHPHSVDS
                       *     *          **  *    *     **       *   **   *  *

PAL 1 S.marianum      QSAEQHNQDVNSLGLISARKTAEAVDILKLMSSTYLVALCQSVDLRHLEENMKSTVKNTV
PAL 2 S.marianum      QSAEQHNQDVNSLGLISARKTSEAVEILKLMSTTYLVALCQSIDLRHLEENMRSTVKNTV
HAL P. putida         LPTSANQEDHVSMAPAAGKRLWEMAENTRGVPAIEWLGACQGLDLR---KGLKTSAK---
                               *  *          *                **  ***          *

PAL 1 S.marianum      SQVAKKVLTMGANGELHPSRFCEKDLLRVVDREYVFAYIDDPCSATYPLMQKLRQVLVDH
PAL 2 S.marianum      SQVAKKVLTMGVNGELHPSRFCEKDLLRVVDREYVFAYIDDPCSATYPLMQKLRQVLVDH
HAL P. putida         ---------------LEKARQALRSEVAHYDRDRFFA----------PDIEKAVELLAKG
                                     *   *          **   **          *   *    *

PAL 1 S.marianum      ALNNGETEKNTNTSIFQKIATFEDELKAILPKEVEGVRIAYESDSLSIPSRIKACRSYPL
PAL 2 S.marianum      ALNNGETEKNTSTSIFQKIGAFEDELKAILPKEVEGVRSSYEDGSLAIPNRIKACRSYPL
HAL P. putida         SLT-GLLPAGVLPSL--------------------------------------------
                       *  *        *

PAL 1 S.marianum      YRFVREELGGGFLTGEKVTSPGEEFDKVFTAMCKGEIIDPLLECVQGRNGVPLPIC
PAL 2 S.marianum      YRFVREELGTGFLTGEKVTSPGEEFDKVFTAMCKGQIIDPLLECVEGWNGAPLPIC
HAL P. putida         ---------------------------------------------------------
```

2. Chalkonsynthase: Kalibriergerade für Naringenin

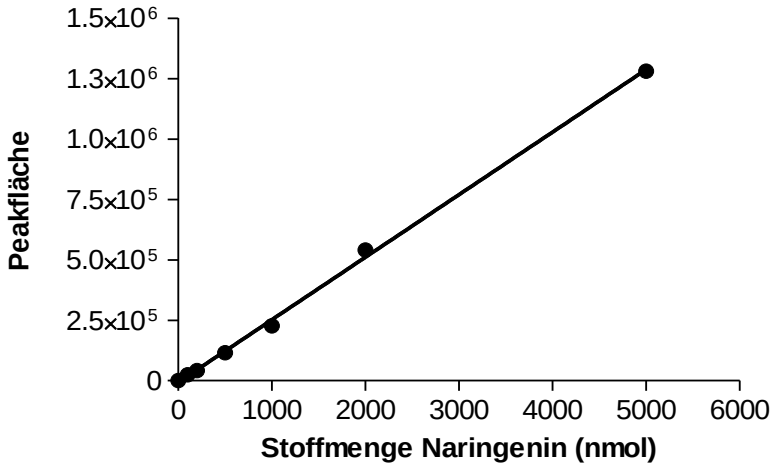


Abb. 54 Kalibriergerade für das Produkt Naringenin: Aufgetragen wurde die errechnete Peakfläche an der HPLC gegen die bekannte Konzentration an Naringenin

3. Cinnamoyl-CoA Reduktase: Spektrum der einzelnen Substrate und des Kofaktors

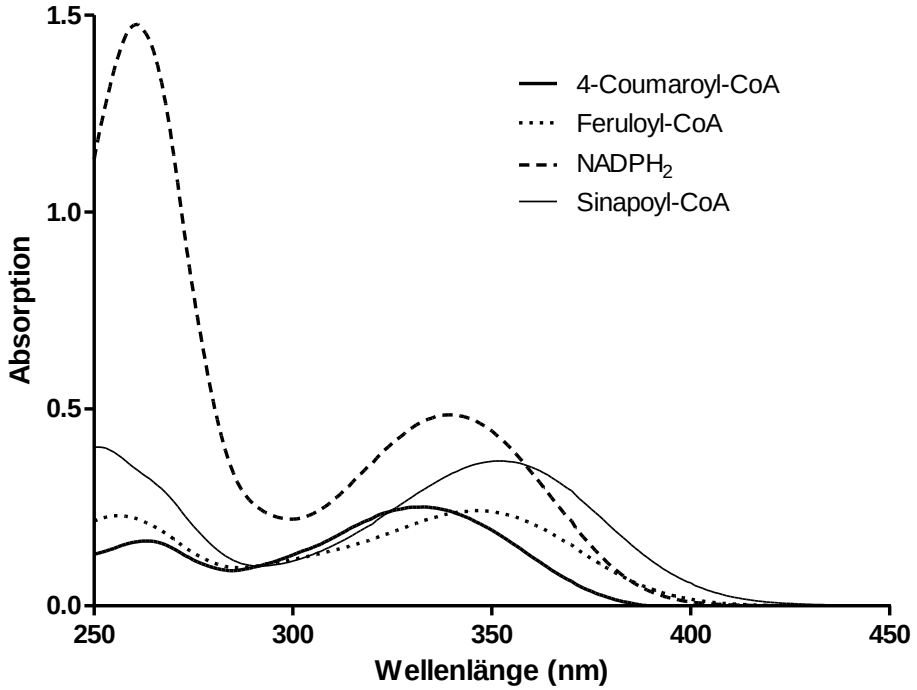


Abb. 55 CCR: Aufgenommenes Spektrum der einzelnen Substrate und des Kofaktors. Absorptionsmaxima: 4-Cumaroyl-CoA: 333 nm, Sinapoyl-CoA: 352 nm, $NADPH_2$: 340 nm Feruloyl-CoA: 346 nm. Alle enzymatischen Nachweisreaktionen wurden unabhängig vom Substrat bei einer Wellenlänge von 366 nm durchgeführt und dokumentieren die Abnahme der $NADPH_2$ Konzentration.

IX. Literaturverzeichnis

Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F (2010) Milk thistle in liver diseases: past, present, future. Phytother Res 24: 1423–1432. DOI: 10.1002/ptr.3207.

Adam G, Läuger P, Stark G (2009) Physikalische Chemie und Biophysik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Ahmed HS, Mohamed WR, Moawad AS, Owis AI, Ahmed RR, AbouZid SF (2020) Cytotoxic, hepatoprotective and antioxidant activities of *Silybum marianum* variety *albiflorum* growing Egypt. Nat Prod Res 34: 3540–3544. DOI: 10.1080/14786419.2019.1582039.

Akcakaya A (2021) Problems of Healthcare Professionals in COVID-19 Pandemic. Bezmialem Sci 9: 1–2. DOI: 10.14235/bas.galenos.2021.5938.

Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. J Exp Bot 60: 377–390. DOI: 10.1093/jxb/ern277.

Appert C, Logemann E, Hahlbrock K, Schmid J, Amrhein N (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum Nym*.). Eur J Biochem 225: 491–499. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.00491.x.

Austin MB, Noel JP (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. Nat Prod Rep 20: 79–110. DOI: 10.1039/b100917f.

Babaoğlu Aydaş S, Şirin S, Aslim B (2016) Biochemical analysis of *Centaurea depressa* phenylalanine ammonia lyase (PAL) for biotechnological applications in phenylketonuria (PKU). Pharm biol 54 (12): 2838–2844. DOI: 10.1080/13880209.2016.1185634.

Bader M (2020) ACE2 – das missbrauchte Multitalent. Nephrologe 15, 375–380. DOI: 10.1007/s11560-020-00448-0.

Barros J, Dixon RA (2020) Plant Phenylalanine/Tyrosine Ammonia-lyases. Trends Plant Sci 25 (1): 66–79. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.09.011.

Bernards, MA (2010) Plant natural products: a primer The present review is one in the special series of reviews on animal–plant interactions. Can J Zool 88 (7): 601–614. DOI: 10.1139/Z10-035.

Beubler E (2011) Kompendium der Pharmakologie. Gebräuchliche Arzneimittel in der Praxis. Springer Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-662-54559-1

Bezanson GS, Desaty , Emes AV, Vining LC (1970) Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*. Can J Microbiol 16 (3): 147–151. DOI: 10.1139/m70-026.

Bijak M (2017) Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)-Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. Molecules 22(11): 1942. DOI: 10.3390/molecules22111942.

Bomati, EK, Noel JP (2005) Structural and kinetic basis for substrate selectivity in *Populus tremuloides* sinapyl alcohol dehydrogenase. Plant Cell 17 (5): 1598–1611. DOI: 10.1105/tpc.104.029983.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt Biochem 72 (1-2): 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Brijwani K, Rigdon A, Vadlani PV (2010) Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. Enzyme research 2010 DOI: 10.4061/2010/149748.

Britton, HTS, Robinson RA (1931) CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. J. Chem. Soc. 0 (0): 1456–1462. DOI: 10.1039/JR9310001456.

Bukh C, Nord-Larsen PH, Rasmusse, SK (2012) Phylogeny and structure of the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Brachypodium distachyon*. J Exp Bot 63 (17): 6223–6236. DOI: 10.1093/jxb/ers275.

Castro AHF, Coimbra MC, Dias da Fonseca ST, Aparecida de Melo Souza A (2020) Phenylalanine Ammonia-Lyase in higher Plants: A key enzyme for plant development. Adv Chem Res 59 (59).

Cavaretta M (2015) Therapeutic Review: Milk Thistle. J Exot Pet Med 24 (4): 470–472. DOI: 10.1053/j.jepm.2015.09.001.

Chao N, Li N, Qi Q, Li S, Lv T, Jiang XN, Gai Y (2016) Characterization of the cinnamoyl-CoA reductase (CCR) gene family in *Populus tomentosa* reveals the enzymatic active sites and evolution of CCR. Planta 245(1): 61-75. doi: 10.1007/s00425-016-2591-6

Chao N, Liu SX, Liu BM, Li N, Jiang XN, Gai Y (2014) Molecular cloning and functional analysis of nine cinnamyl alcohol dehydrogenase family members in *Populus tomentosa* . Planta 240: 1097–1112 https://doi.org/10.1007/s00425-014-2128-9

Chomczynski, P, Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 (1): 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

Christensen AB, Gregersen PL, Schröder J, Collinge DB (1998) A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. Plant mol Biol 37 (5): 849–857. DOI: 10.1023/A:1006031822141.

Corchete P (2008) *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the Source of Silymarin. In: Ramawat KG, Merillon JM: Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Springer Berlin Heidelberg: 123–148.

Cornish-Bowden A, Eisenthal R (1974) Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. Biochem. J 139 (3): 721–730. DOI: 10.1042/bj1390721.

Cove DJ, Perroud PF, Charron AJ, McDaniel SF.; Khandelwal A,Quatrano RS (2009) Isolation and regeneration of protoplasts of the moss *Physcomitrella patens*. Cold Spring Harb Protoc. 2009 (2) DOI: 10.1101/pdb.prot5140.

Dare AP, Tomes S, Jones M, McGhie TK, Stevenson DE, Johnson RA (2013) Phenotypic changes associated with RNA interference silencing of chalcone synthase in apple (*Malus* × *domestica*). Plant J Mol Biol 74 (3): 398–410. DOI: 10.1111/tpj.12140.

Davin LB, Lewis NG. (2000) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. Plant Physiol 123 (2): 453–462. DOI: 10.1104/pp.123.2.453.

Davin, LB, Wang HB, Crowell AL, Bedgar DL, Martin DM, Sarkanen S, Lewis NG (1997) Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. Science 275 (5298): 362–366. DOI: 10.1126/science.275.5298.362.

Delmas D, Xiao J, Vejux A, Aires V (2020) Silymarin and Cancer: A Dual Strategy in Both in Chemoprevention and Chemosensitivity. Molecules 25 (9) DOI: 10.3390/molecules25092009.

Dittmer NT, Kanost MR (2010) Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. Insect Biochem Mol Biol 40 (3): 179–188. DOI: 10.1016/j.ibmb.2010.02.006.

Ebel J, Grisebach H. (1973) Reduction of cinnamic acids to cinnamyl alcohols with an enzyme preparation from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). FEBS Letters 30 (2): 141–143. DOI: 10.1016/0014-5793(73)80637-4.

Effenberger I, Harport M, Pfannstiel J, Klaiber I, Schaller A (2017) Expression in *Pichia pastoris* and characterization of two novel dirigent proteins for atropselective formation of gossypol. Appl Microbiol Biotechnol 101 (5): 2021–2032. DOI: 10.1007/s00253-016-7997-3.

Effenberger I, Zhang B, Li L, Wang Q, Liu Y, Klaiber I, et al. (2015) Dirigent Proteins from Cotton (*Gossypium sp*.) for the Atropselective Synthesis of Gossypol. Angew Chem Int Ed 54 (49): 14660–14663. DOI: 10.1002/anie.201507543.

Elateeq AA, Sun Y, Nxumalo W, Gabr AMM (2020) Biotechnological production of silymarin in *Silybum marianum* L.: A review. Biocatal Agri Biotech 29: 101775. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101775.

El-Garhy HAS, Khattab S, Moustafa MMA, Abou AR, Abdel Azeiz AZ, Elhalwagi A, El Sherif F (2016) Silybin content and overexpression of chalcone synthase genes in *Silybum marianum* L. plants under abiotic elicitation. Plant Physiol Biochem *: PPB* 108: 191–202. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.07.011.

Emiliani G, Fondi M, Fani R, Gribaldo S (2009) A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. Biol direct 4 DOI: 10.1186/1745-6150-4-7.

Escamilla-Treviño LL, Shen H, Uppalapati SR, Ray T, Tang Y, Hernandez T, et al. (2010) Switchgrass (*Panicum virgatum*) possesses a divergent family of cinnamoyl CoA reductases with distinct biochemical properties. New Phyto 185 (1): 143–155. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03018.x.

Ferrer JL, Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. Nat. Struct Biol 6 (8): 775–784. DOI: 10.1038/11553.

Ferrer JL, Austin MB, Stewart C, Noel JP (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiol Biochem 46 (3): 356–370. DOI: 10.1016/j.plaphy.2007.12.009.

Fliegmann J, Schröder G, Schanz S, Britsch L, Schröder J (1992) Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. Plant Mol *Biol* 18 (3): 489–503. DOI: 10.1007/BF00040665.

Gad D, El-Shora H, Fraternale D, Maricchiolo E, Pompa A, Dietz KJ (2021) Bioconversion of Callus-Produced Precursors to Silymarin Derivatives in *Silybum marianum* Leaves for the Production of Bioactive Compounds. Int J Mol Sci 22(4): 2149. https://doi.org/10.3390/ijms22042149

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50 (1): 151–158. DOI: 10.1016/0014-4827(68)90403-5.

Gey MH (2008) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Springer Berlin Heidelberg. DOI: doi:10.1007/978-3-662-46255-3

Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. Yeast 11 (4): 355–360. DOI: 10.1002/yea.320110408.

Goffner D, Campbell MM, Campargue C, Clastre M, Borderies G, Boudet A, Boudet AM (1994) Purification and Characterization of Cinnamoyl-Coenzyme A:NADP Oxidoreductase in *Eucalyptus gunnii*. Plant Physiol 106 (2): 625–632. DOI: 10.1104/pp.106.2.625.

Gomaa OM, Momtaz OA (2015) Copper induction and differential expression of laccase in *Aspergillus flavus*. Braz J Microbiol 46 (1): 285–292. DOI: 10.1590/S1517-838246120120118.

Hamada K, Nishida T, Yamauchi K, Fukushima K, Kondo R, Tsutsumi Y (2004) 4-Coumarate:coenzyme A ligase in black locust (*Robinia pseudoacacia*) catalyses the conversion of sinapate to sinapoyl-CoA. J Plant Res 117 (4): 303–310. DOI: 10.1007/s10265-004-0159-1.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J Mol Biol* 166 (4): 557–580. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.

Hanson KR (1981) Phenylalanine ammonia-lyase: A model for the cooperativity kinetics induced by d- and l-phenylalanine. Arch Biochem Biophys 211 (2): 564–574. DOI: 10.1016/0003-9861(81)90491-4.

Havir EA (1981) Modification of L-phenylalanine ammonia-lyase in soybean cell suspension cultures by 2-aminooxyacetate and L-2-aminooxy-3-phenylpropionate. Planta 152 (2): 124–130. DOI: 10.1007/BF00391183.

Havir EA, Hanson KR (1973) L-phenylalanine ammonia-lyase (maize and potato). Evidence that the enzyme is composed of four subunits. Biochem 12 (8): 1583–1591. DOI: 10.1021/bi00732a019.

Heldt HW, Piechulla B (2015) Pflanzenbiochemie. Springer Spektrum, Berlin. DOI 10.1007/978-3-662-44398-9

Hellio C, Legal Y (1999) Histidase from the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta* : purification and partial characterization. Eur J Phyco 34 (1): 71–78. DOI: 10.1080/09670269910001736102.

Hellio C, Veron B, Le Gal Y (2004) Amino acid utilization by *Chlamydomonas reinhardtii*: specific study of histidine. Plant Physiol Biochem 42 (3): 257–264. DOI: 10.1016/j.plaphy.2003.12.005.

Hrazdina G, Kreuzaler F, Hahlbrock K, Grisebach H (1976) Substrate specificity of flavanone synthase from cell suspension cultures of parsley and structure of release products in vitro. Arch Biochem Biophys 175 (1): 392–399. DOI: 10.1016/0003-9861(76)90526-9.

Hua C (2012) Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase gene in *Ginkgo biloba*: Effects on lignification and environmental stresses. Afr. J. Biotechnol. 11 (26). DOI: 10.5897/AJB11.3704.

Hyun MW, Yun YH, Kim JY, Kim SH (2011) Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase. *Mycobiology* 39 (4): 257–265. DOI: 10.5941/MYCO.2011.39.4.257.

Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R, Callewaert N (2009) Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. Nature Protoc 4 (1), S. 58–70. DOI: 10.1038/nprot.2008.213.

Janusz G, Pawlik A, Świderska-Burek U, Polak J, Sulej J, Jarosz-Wilkołazka A, Paszczyński A (2020) Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. Int J Mol sci 21 (3). DOI: 10.3390/ijms21030966.

Jiang C, Schommer CK, KimSY, Suh DY (2006) Cloning and characterization of chalcone synthase from the moss, *Physcomitrella patens*. Phytochem 67 (23): 2531–2540. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.09.030.

Jorrín J (1988) Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. Biochim. Biophys. Acta 964 (1): 73–82. DOI: 10.1016/0304-4165(88)90069-4.

Jun SY, Sattler SA, Cortez GS, Vermerris W, Sattler SE, Kang CH (2018) Biochemical and Structural Analysis of Substrate Specificity of a Phenylalanine Ammonia-Lyase. Plant Physiol176 (2): 1452–1468. DOI: 10.1104/pp.17.01608.

Kalghatgi KK, Subba Rao PV (1975) Microbial L-phenylalanine ammonia-lyase. Purification, subunit structure and kinetic properties of the enzyme from *Rhizoctonia solani*. Biochem J 149 (1): 65–72. DOI: 10.1042/bj1490065.

Kamel MY, Maksoud SA (1978) Co-Factor Requirements and Factors Affecting L-Histidine Ammonia-Lease Activity in *Vicia faba*. Pflanzenphysiol 88 (3): 255–262. DOI: 10.1016/S0044-328X(78)80247-5.

Karges BM, Wagner N (2017) Pädiatrie in 5 Tagen. Springer Berlin Heidelberg

Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, HasegawaK, Wakabayashi K, Takahashi H (2006) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. Proc Natl Acad Sci USA 103 (1): 230–235. DOI: 10.1073/pnas.0509875103.

Keil DJ, Silybum, in Jepson Flora Project (eds.) Jepson eFlora. https://ucjeps.berkeley.edu/eflora/eflora_display.php?tid=609,, zuletzt geprüft am 08.06.2021.

Kim KW, Moinuddin, SGA, Atwell KM, Costa MA, Davin LB, Lewis NG (2012) Opposite Stereoselectivities of Dirigent Proteins in Arabidopsis and Schizandra Species*. J biol chem 287 (41): 33957–33972. DOI: 10.1074/jbc.M112.387423.

Kim SJ, Kim MR, Bedgar DL, Moinuddin SGY, Cardenas CL, Davin LB, et al. (2004) Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 101 (6): 1455–1460. DOI: 10.1073/pnas.0307987100.

Koprivova A, Altmann F, Gorr G, Kopriva S, Reski R, Decker EL (2003) N-Glycosylation in the Moss *Physcomitrella patens* is Organized Similarly to that in Higher Plants. Plant Biol 5 (6): 582–591. DOI: 10.1055/s-2003-44721.

KOUKOL J, CONN EE (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. J Biol Chem 236: 2692–2698.

Kröner C, Koletzko B (2010) Basiswissen Pädiatrie. Berlin: Springer Verlag, Berlin

Kyndt JA, Meyer TE, Cusanovich MA, van Beeumen JJ (2002) Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. FEBS Letters 512 (1-3); 240–244. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02272-X.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259) : 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

Leplé JC, Dauwe R, Morreel K, Storme V, Lapierre C, Pollet B (2007) Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. Plant Cell 19 (11): 3669–3691. DOI: 10.1105/tpc.107.054148.

Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM (1995) Low Temperature Induces the Accumulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Chalcone Synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a Light-Dependent Manner. Plant Physiol 108 (1): 39–46. DOI: 10.1104/pp.108.1.39.

Li X, MaD, Chen J, PuG, JiY, Lei C (2012) Biochemical characterization and identification of a cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*. *Plant Sci* 193-194: 85–95. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.05.011.

Lim HW, Park SS, Lim CJ (1997) Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from leaf mustard. Mol Cells 7 (6): 715–720.

Liu J, Hao XL, He XQ (2021) Characterization of three chalcone synthase-like genes in *Dianthus chinensis*. Plant Cell Tiss Organ Cult DOI: 10.1007/s11240-021-02081-8.

Lohs K, Elstner P (2009) Fachlexikon Toxikologie. Springer Verlag Berlin Online

Lüderitz T, Grisebach H (1981) Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol: NADP+ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). Eur. J. Biochem. 119 (1): 115–124. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05584.x.

Lv Y, Gao S, Xu S, Du G, Zhou J, Chen J (2017) Spatial organization of silybin biosynthesis in milk thistle *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Plant J Cell Mol Bio 92 (6): 995–1004. DOI: 10.1111/tpj.13736.

Ma QH (2007) Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase that is associated with stem development in wheat. J Exp Bot 58 (8): 2011–2021. DOI: 10.1093/jxb/erm064.

Ma QH, Tian B (2005) Biochemical characterization of a cinnamoyl-CoA reductase from wheat. Biol Chem 386 (6):553–560. DOI: 10.1515/BC.2005.065.

Martinelli T (2019) Identification of Milk Thistle Shatter-Resistant Mutant Lines with Altered Lignocellulosic Profile for the Complete Domestication of the Species. Crop Sci 59 (5): 2119–2127. DOI: 10.2135/cropsci2019.02.0103.

Moffitt MC, Louie GV, Bowman ME, Pence J, Noel JP, Moore BS (2007) Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: kinetic and structural characterization. Biochem 46 (4): 1004–1012. DOI: 10.1021/bi061774g.

Munk K, BilgerW (2009) Botanik. Thieme Verlag, Stuttgart

Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant 15 (3): 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Nabuqi N, Wu S, Takata N, Sakamoto S, Yamamoto M, et al. (2020) Simultaneous manipulation of lignin structure and secondary cell wall formation in transgenic poplar. J Wood Sci 66 (1). DOI: 10.1186/s10086-020-01902-2.

Nagai N, Kojima Y, Shimosaka M, Okazaki M (1988) Effects of Kinetin on l -Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Tobacco Cell Culture. Agr Biol Chem 52 (10): 2617–2619. DOI: 10.1080/00021369.1988.10869090.

Nari J, Mouttet C, Fouchier F, Ricard J (1974) Subunit interactions in enzyme catalysis. Kinetic analysis of subunit interactions in the enzyme L-phenylalanine ammonia-lyase. In: Eur J Biochem 41 (3): 499–515. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03291.x.

Nazemian F, Karimi G, Moatamedi M, Charkazi S, Shamsara J, Mohammadpour AH (2010) Effect of silymarin administration on TNF-α serum concentration in peritoneal dialysis patients. Phyto Res 24 (11): 1654–1657. DOI: 10.1002/ptr.3175.

O'malley DM, Porter S, Sederoff RR (1992) Purification, Characterization, and Cloning of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Physiol* 98 (4): 1364–1371. DOI: 10.1104/pp.98.4.1364.

Pahlich E (1984) Nicht-hyperbolische Enzymkinetiken (Kooperative Kinetiken). In: Edwin Pahlich (Hg.): Prinzipien der Geschwindigkeitskontrolle von Stoffwechselabläufen. Vieweg und Teubner Verlag, Wiesbaden:108–132.

Pahlich E (1984) Prinzipien der Geschwindigkeitskontrolle von Stoffwechselabläufen. Vieweg und Teubner Verlag, Wiesbaden

Palanisami S, Lakshmanan U (2011) Role of copper in poly R-478 decolorization by the marine *cyanobacterium Phormidium* valderianum BDU140441. World J Microbiol Biotechnol 27 (3): 669–677. DOI: 10.1007/s11274-010-0505-5.

Palit P, Mukhopadhyay A, Chattopadhyay D (2021) Phyto-pharmacological perspective of Silymarin: A potential prophylactic or therapeutic agent for COVID-19, based on its promising immunomodulatory, anti-coagulant and anti-viral property. Phyto res DOI: 10.1002/ptr.7084.

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G (1997) A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. J. Biol. Chem. 272 (50): 31301–31307. DOI: 10.1074/jbc.272.50.31301.

Pan H, Zhou R, Louie GV, Mühlemann JK, Bomati EK, Bowman ME, et al. (2014) Structural studies of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase, key enzymes of monolignol biosynthesis. Plant cell 26 (9): 3709–3727. DOI: 10.1105/tpc.114.127399.

Pandit M, Latha N (2020): In silico studies reveal potential antiviral activity of phytochemicals from medicinal plants for the treatment of COVID-19 infection. Preprint. DOI: 10.21203/rs.3.rs-22687/v1

Pang Y, Shen G, Wu W, Liu X, Lin J, Tan F, et al. (2005) Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba*. Plant Sci 168 (6): 1525–1531. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.02.003.

Park HL, Kim TL, Bhoo SH, Lee TH, Lee SW, Cho MH (2018) Biochemical Characterization of the Rice Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Gene Family. Molecules 23 (10). DOI: 10.3390/molecules23102659.

Passardi F, Zamocky M, Favet J, Jakopitsch C, Penel C, Obinger C, Dunand C (2007) Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are there patches of order in chaos? Gene 397 (1-2): 101–113. DOI: 10.1016/j.gene.2007.04.016.

Pelter A, Hänsel R (1968) The structure of silybin (silybum substance E6), the first flavonolignan. Tetrahedron Lett 9 (25): 2911–2916. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)89610-0.

Peters A, Schneider-Poetsch HAW, Schwarz H, Weissenböck G (1988) Biochemical and Immunological Characterization of Chalcone Synthase from Rye Leaves. J Plant Physiol 133 (2): 178–182. DOI: 10.1016/S0176-1617(88)80134-2.

Pickel B, Pfannstiel J, Steudle A, Lehmann A, Gerken U, Pleiss J, Schaller A (2012) A model of dirigent proteins derived from structural and functional similarities with allene oxide cyclase and lipocalins. FEBS J 279 (11): 1980–1993. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08580.x.

Pickel B, Schaller A (2013) Dirigent proteins: molecular characteristics and potential biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol 97 (19): 8427–8438. DOI: 10.1007/s00253-013-5167-4.

Poppe L (2017) Flavonolignan Biosynthesis in *Silybum marianum* – Potential Regulatory Mechanisms and Candidate Genes. Diss. FB Pharmazie, Phil Univ Marburg DOI: 10.17192/z2017.0674

Poppe L, Petersen M (2016) Variation in the flavonolignan composition of fruits from different *Silybum marianum* chemotypes and suspension cultures derived therefrom. Phytochem 131: 68–75. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.09.003.

Ramawat KG, Merillon J.M (2008) Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-540-74603-4

Reinhammar B (1970) Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernicifera*. Biochim Biophys Acta 205 (1): 35–47. DOI: 10.1016/0005-2728(70)90059-9.

Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H et al. (2008) The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. Science 319:64-69. doi.org/10.1126/science.1150646

Richard S, Lapointe G, Rutledge RG, Séguin A (2000) Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. Plant Cell Physiol 41 (8): 982–987. DOI: 10.1093/pcp/pcd017.

Ritter H, Schulz GE (2004) Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. Plant cell 16 (12): 3426–3436. DOI: 10.1105/tpc.104.025288.

Rogers SO. Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol Biol 5 (2): 69–76. DOI: 10.1007/BF00020088.

Rösler J, Krekel F, Amrhein N, Schmid J (1997) Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. Plant Physiol 113 (1): 175–179. DOI: 10.1104/pp.113.1.175.

Saleh NAM, Fritsch H, Kreuzaler F, Grisebach H (1978) Flavanone synthase from cell suspension cultures of *Haplopappus gracilis* and comparison with the synthase from parsley. Phytochemistry 17 (2):183–186. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)94142-6.

Sanjari S, Shobbar ZS, Ebrahimi M, Hasanloo T, Sadat-Noori SA, Tirnaz S (2015): Chalcone synthase genes from milk thistle (*Silybum marianum*): isolation and expression analysis. J Gen 94 (4): 611–617. DOI: 10.1007/s12041-015-0560-7.

Sarni F, Grand C, Boudet AM (1984) Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus X euramericana*). Eur J Biochem 139 (2): 259–265. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08002.x.

Sattler SA, Walker AM, Vermerris W, Sattler SE, Kang CH (2017) Structural and Biochemical Characterization of Cinnamoyl-CoA Reductases. Plant Physiol 173 (2): 1031–1044. DOI: 10.1104/pp.16.01671.

Schilcher H, Kammerer S, Wegener T, Volkmann D (2010) Leitfaden Phytotherapie. Elsevier Urban & Fischer, Münschen

Scholz H, Schwabe U, Böger RH (2005) Taschenbuch der Arzneibehandlung. Angewandte Pharmakologie ; mit 121 Tabellen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Schulz S, Rune GM (2015) Einfluss von einer L-Phenylalanin-Hydroxylase Defizienz auf die Entwicklung von Synapsen im Model der Pahenu2-Maus. Univ. Hamburg, FB Medizin, Diss., 2015. Hamburg.

Schwede TF, Rétey, J, Schulz GE (1999) Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. Biochemistry 38 (17): 5355–5361. DOI: 10.1021/bi982929q.

Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R (2007) *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. J Bact 189 (23): 8746–8749. DOI: 10.1128/JB.01368-07.

Shinozaki J, Kenmoku H, Nihei K, Masuda K, Noji M, Konno K et al. (2016) Cloning and Functional Analysis of Three Chalcone Synthases from the Flowers of Safflowers *Carthamus tinctorius*. Nat Prod Comm 11 (6). DOI: 10.1177/1934578X1601100621.

Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L, Séguin A (2005) CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. Plant Cell 17 (7): 2059–2076. DOI: 10.1105/tpc.105.030767.

SINDEL BM (1991) A review of the ecology and control of thistles in Australia. Weed Res 31 (4): 189–201. DOI: 10.1111/j.1365-3180.1991.tb01758.x.

Sonawane P, Vishwakarma RK, Khan BM (2013) Biochemical characterization of recombinant cinnamoyl CoA reductase 1 (Ll-CCRH1) from *Leucaena leucocephala*. *Int J Biol Macromol* 58, S. 154–159. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.03.050.

Soylu S (2006) Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. Plant Sci 170 (5): 942–952. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.12.017.

Spohn M, Spohn R (2020): Welche Blume ist das? Kosmos (Kosmos-Naturführer) Stuttgart

Sticher O, Steinegger E (2010) Pharmakognosie - Phytopharmazie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Stöckigt J, Zenk MH (1975) Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. Z Naturforsch C: Biosci 30 (3): 352–358. DOI: 10.1515/znc-1975-5-609.

Strasburger E, Noll FC, Schimper AFW, Kadereit JW, Körner C, Kost B, Sonnewald U (2014): Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften. Springer Spektrum Verlag, Berlin.

Sun W, Meng X, Liang L, Jiang W, Huang Y, He J, et al. (2015) Molecular and Biochemical Analysis of Chalcone Synthase from Freesia hybrid in flavonoid biosynthetic pathway. PloS one 10 (3), e0119054. DOI: 10.1371/journal.pone.0119054.

Sun Y, Wu Y, Zhao Y, Han X, Lou H, Cheng, A (2013) Molecular cloning and biochemical characterization of two cinnamyl alcohol dehydrogenases from a liverwort *Plagiochasma*

appendiculatum. *Plant Physiol Biochem:* 70: 133–141. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.027.

Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. (2020) SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. Nature med 26 (5): 681–687. DOI: 10.1038/s41591-020-0868-6.

Sütfeld R, Wiermann R (1981) Purification of Chalcone Synthase from Tulip Anthers and Comparison with the Synthase from Cosmos Petals. Z Naturforsch C: Biosci 36 (1-2): 30–34. DOI: 10.1515/znc-1981-1-207.

SwainT, Harbone JB, Sumere CF (1979) Biochemistry of Plant Phenolics. Springer Verlag US Boston, MA.

Szilági I, Tétényi P, Antus S, Seligmann O, Chari VM, Seitz M, Wagner H (1981) Struktur von Silandrin und Silymonin, zwei neuen Flavanolignanen aus einer weißblühenden *Silybum marianum* Varietät. Planta Med 43 (2): 121–127. DOI: 10.1055/s-2007-971488.

TARTOF KD (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones. Bethesda Res Lab Focus 9: 12. DOI https://ci.nii.ac.jp/naid/10017053274/.

Toklu HZ, Tunali A, Tugba; Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Gedik N, Keyer-Uysal M, Sener G (2008): Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. J Surg Res 145 (2): 214–222. DOI: 10.1016/j.jss.2007.03.072.

Torres M, Corchete P (2016) Gene expression and flavonolignan production in fruits and cell cultures of *Silybum marianum*. J Plant Physiol 192: 111–117. DOI: 10.1016/j.jplph.2016.02.004.

Tropf S, Kärcher B, Schröder G, Schröder J (1995) Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthase (stilbenes and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones. J Biol Chem 270 (14): 7922–7928. DOI: 10.1074/jbc.270.14.7922.

Ueffing M, Bayyoud T, Schindler M, Ziemssen F, (2020) Grundlagen der Replikation und der Immunologie von SARS-CoV-2. Ophthalmologe: Z Deut Ophthalmol 117 (7): 609–614. DOI: 10.1007/s00347-020-01155-w.

Ullah H, Khan H (2018): Anti-Parkinson Potential of Silymarin: Mechanistic Insight and Therapeutic Standing. Front Pharmacol 9: 422. DOI: 10.3389/fphar.2018.00422.

Valková V (2020) MILK THISTLE (SILYBUM MARIANUM): A VALUABLE MEDICINAL PLANT WITH SEVERAL THERAPEUTIC PURPOSES. JMBFS 9 (4): 836–843. DOI: 10.15414/jmbfs.2020.9.4.836-843.

van Acker R, Déjardin A, Desmet S, Hoengenaert L, Vanholme R, Morreel K, et al. (2017) Different Routes for Conifer- and Sinapaldehyde and Higher Saccharification upon Deficiency in the Dehydrogenase CAD11OPEN. Plant Physiol 175 (3): 1018–1039. DOI: 10.1104/pp.17.00834.

van Acker R, Leplé JC, Aerts D, Storme V, Goeminne G, Ivens B, et al. (2013) Improved saccharification and ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. Proc Natl Acad Sci USA 111 (2): 845–850. DOI: 10.1073/pnas.1321673111.

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin biosynthesis and structure. Plant Physiol 153 (3): 895–905. DOI: 10.1104/pp.110.155119.

Viëtor R, Loutelier-Bourhis C, Fitchette AC, Margerie P, Gonneau M, Faye L, Lerouge P (2003) Protein N-glycosylation is similar in the moss *Physcomitrella patens* and in higher plants. Planta 218 (2): 269–275. DOI: 10.1007/s00425-003-1099-z.

Wagner H, Hörhammer L, Münster R. (1968) Zur Chemie des Silymarins (Silybin), des Wirkprinzips der Früchte von *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). Arzneimittel-Forschung 18 (6): 688–696.

Wang B, Yan Y, Tian Y, Zhao W, Li Z, Gao J (2016): Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes. World J Microbiol Biotechnol 32 (3): 40. DOI: 10.1007/s11274-015-1999-7.

Welinder KG (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Curr. Opin. Struc Biol 2 (3): 388–393. DOI: 10.1016/0959-440X(92)90230-5.

Wengenmayer H, Ebel J, Grisebach H (1976) Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of a cinnamoyl-CoA: NADPH reductase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). Eur J Biochem 65 (2): 529–536. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb10370.x.

Whitehead IM, Dixon RA (1983) Chalcone synthase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. Biochim. Biophys. Acta 747 (3): 298–303. DOI: 10.1016/0167-4838(83)90109-7.

Williams JS, Thomas M, Clarke DJ (2005) The gene stlA encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photorhabdus luminescens* TT01. Microbiol 151 (Pt 8): 2543–2550. DOI: 10.1099/mic.0.28136-0.

Wohl J (2020) Molekulare und biochemische Untersuchung von Genen und Enzymen des Stoffwechsels phenolischer Verbindungen im Hornmoos *Anthoceros agrestis*. Diss. FB Pharmazie, Phil Univ Marburg, https://doi.org/10.17192/z2020.0221

Won DH, Kim LH, Jang B, Yang ICH, Kwon HJ, Jin B, et al. (2018) In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. Oncodev Biol Med 40 (5). DOI: 10.1177/1010428318776170.

Wu Z, Gui S, Wang S, Ding Y (2014) Molecular evolution and functional characterisation of an ancient phenylalanine ammonia-lyase gene (NnPAL1) from *Nelumbo nucifera:* novel insight into the evolution of the PAL family in angiosperms. BMC Evol Biol 14: 100. DOI: 10.1186/1471-2148-14-100.

Xiang L, Moore BS (2002) Inactivation, complementation, and heterologous expression of encP, a novel bacterial phenylalanine ammonia-lyase gene. J Biol Chem 277 (36): 32505–32509. DOI: 10.1074/jbc.M204171200.

Xue Z, McCluskey M, Cantera K, Sariaslani FS, Huang L (2007) Identification, characterization and functional expression of a tyrosine ammonia-lyase and its mutants from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. J Ind Microbiol Biotechnol 34 (9), S. 599–604. DOI: 10.1007/s10295-007-0229-1.

Yaghmaei P, Azarfar K, Dezfulian M, Ebrahim-Habibi A (2014) Silymarin effect on amyloid-β plaque accumulation and gene expression of APP in an Alzheimer's disease rat model. DARU J Pharm Sci 22 (1): 24. DOI: 10.1186/2008-2231-22-24.

Yahyaa M, Ali S, Davidovich-Rikanati R, Ibdah M, Shachtier A, Eyal Y, et al. (2017) Characterization of three chalcone synthase-like genes from apple (*Malus x domestica* Borkh.). Phytochem 140: 125–133. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.04.022.

Yu HN, Wang L, Sun B, Gao S, Cheng AX, Lou HX (2015) Functional characterization of a chalcone synthase from the liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. Plant Cell Rep 34 (2): 233–245. DOI: 10.1007/s00299-014-1702-8.

Yuan YW, Rebocho AB, Sagawa JM, Stanley LE, Bradshaw HD (2016) Competition between anthocyanin and flavonol biosynthesis produces spatial pattern variation of floral pigments between Mimulus species. Proc Natl Acad Sci USA 113 (9): 2448–2453. DOI: 10.1073/pnas.1515294113.

Zenk MH (1979) Recent Work on Cinnamoyl CoA Derivatives. IN Swain T, Harbone JB, Sumere CF, Biochemistry of Plant Phenolics. US (Rec Adv Phytochem 12): 139–176 Boston, MA: Springer.

Zhou B, Li Y, Xu Z, Yan H, Homma S, Kawabata S (2007) Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). J Exp Bot 58 (7): 1771–1781. DOI: 10.1093/jxb/erm036.

Zhou R, Jackson L, Shadle G, Nakashima J, Temple S, Chen F, Dixon RA (2010) Distinct cinnamoyl CoA reductases involved in parallel routes to lignin in *Medicago truncatula*. Proc Natl Acad Sci USA 107 (41), S. 17803–17808. DOI: 10.1073/pnas.1012900107.

Lebenslauf

Name: Sandra Ditzler

Geburtstag: 08.03.1984

Berufserfahrung

seit 07/2017	Philipps-Universität **Marburg, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie** Wissenschaftliche Mitarbeiterin
04/2011 – 12/2013	**Fraunhofer Institut (IME), Gießen** Wissenschaftliche Mitarbeiterin
04/2010 – 10/2010	**Deutsches Zentrum für Marine Biodiversitätsforschung, Wilhelmshaven** Wissenschaftliche Mitarbeiterin
06/2009 – 03.2010	**Biologische Anstalt Helgoland und Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven** Diplom Bioingenieurin

Akademische Laufbahn

Promotion

seit 07/2017	Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Thema der Dissertation: Untersuchungen zum Biosyntheseweg von Flavonolignanen in der Mariendistel *Silybum marianum*.

Master of Science (Biopharmazeutische Technologie)
90 ECTS; Note: gut

02/2012 – 05/2017	Technische Hochschule Mittelhessen, Gießen Thema der Abschlussarbeit: Interaktionen von nanoskaligen Arzneistoffträgern mit Modellmembranen unter der besonderen Berücksichtigung toxikologischer Aspekte.

Diplom (Bioingenieurin)
180 ECTS; Note: gut

04/2003 – 02/2009	Fachhochschule Aachen, Campus Jülich Thema der Abschlussarbeit: Isolierung und Charakterisierung einer neuen extrazellulären Phosphatase aus dem Verdauungstrakt des Europäischen Hummers (*Hommarus gammarus*)