

**Die Sanguinarin-Reduktase - ein neues Redoxenzym  
mit essentiellen Funktionen in Metabolismus und Kompartimentierung  
der Benzophenanthridine  
in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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

von Dagmar Weiß  
geboren am 06.07.1974 in Schlema (Erzgebirge)

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Roos, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. D. Strack, Halle (Saale)
3. Prof. Dr. M. Wink, Heidelberg

Halle (Saale), 13.10.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007591**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007591>]

---

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	5
<b>1.1</b>	<b>Pflanzliche Sekundärstoffe als Signale und Toxine</b>	5
<b>1.2</b>	<b>Resistenzmechanismen gegenüber pflanzlichen Sekundärstoffen</b>	6
1.2.1	Kompartimentierung in der produzierenden Pflanze	6
1.2.2	Metabolisierung durch die produzierende Pflanze	8
1.2.3	Metabolisierung pflanzlicher Sekundärstoffe in Mikroorganismen	9
1.2.4	Metabolisierung von Pilz-Toxinen im Produktionsorganismus - das Beispiel Cercosporin	10
<b>1.3</b>	<b>Benzophenanthridine - Toxine von <i>Eschscholzia californica</i></b>	13
1.3.1	Induktion der Synthese von Benzophenanthridinen in Zellsuspensionen von <i>Eschscholzia californica</i>	15
1.3.2	Biosynthese der Benzo[c]phenanthridin-Alkaloide	16
1.3.3	Zur Pharmakologie der Benzophenanthridin-Alkaloide	19
1.3.3.1	Molekulare Targets der Benzophenanthridine	19
1.3.3.2	Antimikrobielle Aktivität der Benzophenanthridine	22
<b>1.4</b>	<b>Zielstellung der vorliegenden Arbeit</b>	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	24
<b>2.1</b>	<b>Kultivierung der Zellsuspensionen</b>	24
<b>2.2</b>	<b>Alkaloidbildung nach Elicitorbehandlung</b>	24
<b>2.3</b>	<b>Inkubation von Zellsuspensionen mit Benzophenanthridinen</b>	24
<b>2.4</b>	<b>Fluorimetrische Quantifizierung der Benzophenanthridine</b>	25
2.4.1	Fluorimeter	25
2.4.2	Fluoreszenzreader	26
<b>2.5</b>	<b>HPLC von Benzophenanthridinen</b>	26
2.5.1	Extraktion aus Zellsuspensionen	26
2.5.1.1	Experimente zur Alkaloidbildung	26
2.5.1.2	Experimente zur Metabolisierung extern zugesetzter Alkaloide	27
2.5.1.3	Extraktion zur Gewinnung genuiner Benzophenanthridine	27

---

2.5.2	Chromatographie, Identifizierung und Quantifizierung	29
<b>2.6</b>	<b>Herstellung von Dihydrobenzophenanthridinen</b>	31
<b>2.7</b>	<b>Bestimmung von Wachstumsparametern</b>	31
2.7.1	Frisch- und Trockenmasse	31
2.7.2	Zellzahl	31
<b>2.8</b>	<b>Mikroskopie</b>	31
<b>2.9</b>	<b>Zellfraktionierung</b>	32
<b>2.10</b>	<b>Reduktion von Benzophenanthridinen durch Rohextrakt der löslichen Proteine</b>	33
2.10.1	Reduktion durch 100 000 g-Überstand	33
2.10.2	Reduktion durch ultrafiltrierte Proteinfraction nach Zusatz von Elektronendonatoren	33
<b>2.11</b>	<b>FPLC-Verfahren zur Reinigung der Sanguinarin-Reduktase</b>	34
2.11.1	Pufferlösungen für die FPLC	34
2.11.2	Zellaufschluß und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	34
2.11.3	FPLC-Reinigungsschritte	35
<b>2.12</b>	<b>Assays zur Bestimmung von Enzymaktivitäten</b>	37
2.12.1	Aktivitätsbestimmung der Sanguinarin-Reduktase	38
2.12.2	Aktivitätsbestimmung der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase	38
2.12.3	Bestimmung der NADPH-Umsetzung durch INT/Diaphorase-Assay	39
<b>2.13</b>	<b>SDS-Gelelektrophorese</b>	41
<b>2.14</b>	<b>Bestimmung der Molekülmasse durch Gelfiltration</b>	42
<b>2.15</b>	<b>Teilsequenzierung des Sanguinarin-Reduktase-Proteins</b>	43
<b>2.16</b>	<b>Proteinbestimmung</b>	43
<b>2.17</b>	<b>Chemikalien</b>	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	44
<b>3.1</b>	<b>Das Spektrum der in <i>Eschscholzia</i>-Zellsuspensionen gebildeten Benzophenanthridine</b>	44
<b>3.2</b>	<b>Aufnahme, Reduktion und Metabolismus zugesetzter Benzophenanthridine durch Zellsuspensionen</b>	48

---

<b>3.3</b>	<b>Reduktion von Sanguinarin durch ein lösliches Enzym</b>	58
<b>3.4</b>	<b>Reinigung der Sanguinarin-Reduktase mittels FPLC</b>	58
3.4.1	Vorversuche und Reinigungsstrategie	58
3.4.2	FPLC-Reinigungsschritte	61
3.4.3	Bestimmung der Molekülmasse	64
<b>3.5</b>	<b>Eigenschaften der Sanguinarin-Reduktase</b>	67
3.5.1	Optimaler pH-Bereich	67
3.5.2	Einfluß der Substratkonzentration auf die Umsetzung von Sanguinarin	67
3.5.3	Substratspezifität der Sanguinarin-Reduktase-Reaktion	72
3.5.3.1	Vergleichende Untersuchungen in Proteinmischungen unterschiedlicher Komplexität	72
3.5.3.2	Umsatzraten der Reduktion Sanguinarin-ähnlicher Alkaloide	72
3.5.3.3	Ausgewählte Substrate der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen	79
3.5.4	Identifizierung des Sanguinarin-Reduktase-Proteins durch Teilsequenzierung und Massenspektrometrie	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	83
<b>4.1</b>	<b>Die Sanguinarin-Reduktase - ein neues Enzym des Benzo-phenanthridin-Metabolismus</b>	83
<b>4.2</b>	<b>Die zelluläre Funktion der Sanguinarin-Reduktase</b>	85
4.2.1	Kopplung von Aufnahme und Reduktion	85
4.2.2	Wechselspiel zwischen Sanguinarin-Reduktase und Dihydrobenzo-phenanthridin-Oxidase	86
4.2.3	Turnover von Sanguinarin	88
<b>5</b>	<b>Ausblick auf weiterführende Experimente</b>	92
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	93
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	95
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	110
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	112

## 1 Einleitung

### 1.1 Pflanzliche Sekundärstoffe als Signale und Toxine

Die unüberschaubare Vielfalt ihrer Sekundärstoffe ermöglicht pflanzlichen Organismen zahlreiche spezies-spezifische Anpassungs- und Reaktionsmöglichkeiten in der Auseinandersetzung mit der Umwelt. Biologisch vorteilhafte Funktionen ergeben sich vor allem auf folgenden Gebieten:

- Viele Sekundärstoffe dienen als Signale bei der Kommunikation von Pflanzen mit tierischen Organismen. Pigmente (Anthocyanine, Carotinoide, Flavonoide) sowie Geschmacks- und Geruchsstoffe (Monoterpene, Sesquiterpene) ermöglichen die Anlockung von bestäubenden Insekten oder samenverbreitenden Tieren [Teuscher 1984, Harborne 1995a, Raguso 2003].
- Einige pflanzliche Sekundärstoffe, z. B. Isoflavonoide, Ecdysone und die u. a. aus *Senecio*-Arten bekannten Pyrrolizidin-Alkaloide, wirken im tierischen Organismus als Signale bzw. werden in solche umgewandelt [Harborne 1995c, Hartmann und Ober 2000, Eisner und Meinwald 2003]. Die estrogenen Aktivität verschiedener Isoflavonoide und die ausgeprägte Hormonwirkung der Phytoecdysone verursachen Infertilität bzw. Wachstumsstörungen in Säugetieren und Insekten und bieten damit einen gewissen Schutz vor Fraßfeinden.
- Pflanzliche Sekundärstoffe haben einen hervorragenden Anteil an der chemischen Verteidigung gegenüber Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze) und Herbivoren (Nematoden, Insekten, Mollusken, Vertebraten) [Harborne 1995b,d,e; Cowan 1999; Harborne *et al.* 1999; Dorman und Deans 2000; Karioti *et al.* 2002].

Zu den konstitutiven antimikrobiellen Verbindungen zählen u. a. pflanzliche Phenole, z. B. Lignine und Tannine in Zellwänden und Vakuolen [Baur und Walkinshaw 1974, Grisebach 1981]. Das Spektrum der konstitutiven Abwehrtoxine wird durch Saponine, cyanogene Glycoside, Glucosinolate u. a. ergänzt [Oßwald 1995, Osbourn 1996].

Induzierbare Abwehrmetabolite sind die Phytoalexine, deren Strukturvielfalt u. a. Isoflavonoide (Kieviton, Pisatin, Medicarpin), Terpene (Rishitin, Phytuberin, Gossypol), Polyacetylene (Falcarinisol, Safynol, Weyeronsäure) sowie Alkaloide (Sanguinarin, Chelerythrin) umfaßt [Oßwald 1995, Schumacher *et al.* 1987].

Die Wirkung pflanzlicher Sekundärstoffe auf Mikroorganismen und Tiere resultiert aus der Interaktion mit essentiellen Stoffwechselreaktionen des Angreifers, u. a.:

- Hemmung der Nucleinsäuresynthese: Camptothecin,  $\alpha$ -Amanitin [Hock 1995];
- Hemmung der Proteinsynthese: Ricin, Abrin [Hock 1995];
- Störung von Membranfunktionen: Rishitin u. a. Isoflavonoide, Saponine [Oßwald 1995];
- Hemmung der Kern- und Zellteilung: Colchicin, Podophyllotoxin, Vinca-Alkaloide [Hock 1995];
- Hemmung der mitochondrialen Atmung: Isoflavonoide, z. B. Rotenon, Glyceollin; Cyanid [Hock 1995, Oßwald 1995].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Benzophenanthridine sind quarternäre Isochinolin-Alkaloide. Die antimikrobielle Aktivität dieser Verbindungen ist u. a. zurückzuführen auf amphiphile Wechselwirkungen mit Zellmembranen, die Hemmung von SH-abhängigen Enzymen und die Interkalation in DNA (Details s. 1.3.3.1).

Die positive Auslese der Phytoalexin-produzierenden Pflanzen in der Evolution setzt voraus, daß die Biosynthese und Speicherung dieser Verbindungen ohne eine nennenswerte Beeinträchtigung der primären Lebensfunktionen der produzierenden Organismen erfolgen konnte. Da die meisten pflanzlichen Sekundärstoffe auch analoge Strukturen in der produzierenden Zelle angreifen, ergab sich daraus u. a. ein Selektionsdruck zur Ausbildung effektiver Mechanismen zum Schutz vor den eigenen Toxinen. Andererseits haben auch Mikroorganismen und Herbivore Abwehrmechanismen entwickelt, um Pflanzen als Nahrung nutzen zu können.

## **1.2 Resistenzmechanismen gegenüber pflanzlichen Sekundärstoffen**

### **1.2.1 Kompartimentierung in der produzierenden Pflanze**

Um eine Autotoxizität für die produzierenden Pflanzen zu verhindern, werden die gebildeten Sekundärstoffe häufig durch intrazelluläre Kompartimentierung bzw. Exkretion vom Cytoplasma getrennt. Dies gewährleistet außerdem die Anreicherung effektiver Konzentrationen an biologisch aktiven Verbindungen.

- Stark lipophile Sekundärstoffe, u. a. ätherische Öle und Kautschuk, akkumulieren als Lipidtröpfchen im Cytosol und bilden damit ein nicht mischbares Zweiphasensystem [Schnepf 1973, Roos und Luckner 1986]. Die lipophilen Ergolin-Alkaloide werden z. B. in intrazellulären Lipidtropfen eingelagert [Neumann *et al.* 1979].
- Eine Vielzahl an Sekundärstoffen wird in Vakuolen gespeichert, u. a. Phenole (Tannine, Anthocyanine, Flavonoide), Saponine, cyanogene Glycoside, Glucosinolate, Herzglycoside und Alkaloide [Baur und Walkinshaw 1974, Roos und Luckner 1986, Wink 1999].

- Bausteine der Zellwände, z. B. Lignine, Cellulose und Pektine, werden aus den Zellen ausgeschieden und durch extrazelluläre Enzyme polymerisiert [Schnepf 1973, Roos und Luckner 1986]. Paclitaxel, ein Mitosehemmstoff, wird im Apoplasten von *Taxus cuspidata*-Pflanzen gelagert [Russin *et al.* 1995]. Eine Exkretion von Paclitaxel konnte auch in Zellkulturen von *Taxus chinensis* nachgewiesen werden [Wang *et al.* 2001]. Sclareolid, ein Terpenoid-Alkaloid, schützt Blattoberflächen verschiedener *Nicotiana*-Arten vor Pilzbefall. Jasiński und Mitarbeiter [2001] demonstrierten die Ausscheidung von Sclareolid aus Zellen von *Nicotiana plumbaginifolia*. In den Papaveraceen werden Alkaloide häufig in Milchsäfte sezerniert [Neumann 1985, Hauser und Wink 1990, Decker *et al.* 2000].
- Eine besondere Art der Kompartimentierung besteht in der Speicherung inaktiver Vorstufen, die bei Bedarf in toxische Verbindungen umgewandelt werden. Biologisch inaktive cyanogene Glycoside, Senfölglycoside sowie Glycoside der o-Cumarsäure werden in Vakuolen gespeichert. Bei Verletzung der Zellen führt der Kontakt mit cytosolischen bzw. extrazellulären Glucosidasen zur Bildung von reaktiven Verbindungen wie Blausäure, Isothiocyanate, Nitrile, Thiocyanate und Cumarin [Oba *et al.* 1981, Matile 1984, Morrissey und Osbourn 1999].

Die Speicherung der Sekundärstoffe außerhalb des Cytoplasmas erfordert den Transport der Verbindungen durch zelluläre Membranen, u. a. Tonoplast bzw. Plasmamembran. Der Transport erfolgt passiv, z. B. in einigen Fällen als Diffusion lipophiler Verbindungen, als Vesikeltransfer, bei anderen durch aktive Mechanismen unter Beteiligung von Transportproteinen.

- Die Speicherung von quarternären Isochinolin-Alkaloiden (z. B. Berberin und Sanguinarin) in Vakuolen von *Berberis wilsoniae* und *Papaver somniferum* wird durch Vesikel vermittelt, die vermutlich aus dem endoplasmatischen Reticulum gebildet werden und mit der Vakuole fusionieren [Amann *et al.* 1986, Bird und Facchini 2001, Bock *et al.* 2002]. An der Ausscheidung von Pectinen, Cellulose und Schleimen via Exocytose sind Golgi-Vesikel beteiligt [Brown *et al.* 1970, Schnepf 1973].
- Aktive Transportmechanismen sind für die spezies-spezifische Akkumulation von Alkaloiden in Vakuolen verschiedener Pflanzenarten bekannt (u. a. [Deus-Neumann und Zenk 1984]). Für die stereospezifische Aufnahme von (S)-Reticulin und (S)-Scoulerin, Precursoren verschiedener Isochinolin-Alkaloide, in Vakuolen von *Fumaria capreolata* wurde ein hochspezifisches Transportsystem nachgewiesen, welches durch

- ATP-abhängigen Protonentransport energetisiert wird [Deus-Neumann und Zenk 1986]. Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Aufnahme von Lupanin, einem Chinolizidin-Alkaloid, in Vakuolen von *Lupinus polyphyllus* vermutet [Mende und Wink 1987].
- Einige Sekundärstoffe, z. B. Medicarpin [Li *et al.* 1997], werden als GSH-Konjugate durch spezifische ABC-Transporter (Glutathion-S-Konjugat-Pumpe, [Rea *et al.* 1998]) in die Vakuole transportiert. Die Konjugation von endogenen Substraten (u. a. Zimtsäure, Cyanidin-3-glucosid) sowie verschiedenen Xenobiotica mit Glutathion wird durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert [Marrs 1996]. AN9, eine Glutathion-S-Transferase aus *Petunia hybrida*, ist z. B. als Flavonoid-bindendes Protein am Export von Anthocyaninen aus dem Cytosol in Vakuolen beteiligt. Die Bildung eines Anthocyanin-GSH-Konjugates konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [Mueller *et al.* 2000].
  - Für die aktive Exkretion der Terpenoid-Alkaloide Sclareol und Sclareolid sind die ABC-Transporter der Plasmamembran, NpABC1 und SpTUR2, verantwortlich [Jasiński *et al.* 2001, van den Brûle *et al.* 2002].
  - Die Akkumulation von Alkaloiden in Vakuolen wird durch Protonierung (Ionenfalle) sowie durch Komplexbildung mit Pflanzensäuren oder phenolischen Verbindungen unterstützt: Einige Pflanzenarten, z. B. *Catharanthus roseus* und *Macleaya cordata*, entwickelten spezialisierte Alkaloid-Speicherzellen mit einem erniedrigten vakuolären pH-Wert (pH 3) im Vergleich zu pH 5 in Vakuolen der synthetisierenden Zellen [Endress 1994]. Zellkulturen von *Coptis japonica* speichern Berberin (> 70 mM) als gut wasserlösliches Malat [Sato *et al.* 1992]. Morphin und andere Opium-Alkaloide akkumulieren als Salze der Mekonsäure [Teuscher 1997]. Cytotoxische Schöllkraut-Alkaloide (Sanguinarin, Chelerythrin) werden in Vakuolen an Chelidonsäure gebunden [Matile 1976, Hauser und Wink 1990].

### 1.2.2 Metabolisierung durch die produzierende Pflanze

Die Halbwertszeiten einiger Sekundärstoffe lassen auf ihre Metabolisierbarkeit innerhalb der produzierenden Pflanzen schließen. So wird in *Papaver somniferum* gebildetes Morphin innerhalb von 7,5 h zu 50 % umgewandelt. Die Halbwertszeit von Nicotin in *Nicotiana tabacum* beträgt etwa 22 h [Endress 1994].

Untersuchungen an *Coffea arabica* und *Camellia sinensis* ergaben eine altersabhängige Akkumulation und Metabolisierung von Coffein: Höchste Alkaloidkonzentrationen wurden in jungen Blättern und Früchten festgestellt. Der in älteren Pflanzen eintretende Abbau des Coffeins über Theophyllin und Xanthin zu Kohlendioxid und Ammoniak wird limitiert durch



die Demethylierung von Coffein zu Theophyllin [Ashihara *et al.* 1996, 1997].

Besondere Schutzmechanismen sind in Pflanzen erforderlich, welche cyanogene Glycoside produzieren. Die bei Verletzung aus diesen Glycosiden freigesetzte Blausäure hemmt vor allem die mitochondriale Cytochrom-Oxidase. Die Produktion von entgiftenden Enzymen, z. B.  $\beta$ -Cyanoalaninsynthase und Rhodanase [Miller und Conn 1980], ergänzt bzw. komplementiert die Schutzwirkung der in allen Pflanzen vorhandenen cyanid-insensitiven Atmung [Hock 1995].

### 1.2.3 Metabolisierung pflanzlicher Sekundärstoffe in Mikroorganismen

Pilze entwickelten verschiedene Strategien der Resistenz gegen Phytoalexine. Dabei stellt die Metabolisierung ein Hauptprinzip dar. Durch Wasseranlagerung, Hydroxylierungs- und Demethylierungsreaktionen wird die Lipophilie und damit die Toxizität der Phytoalexine reduziert (Tab. 1).

Die Entgiftung von Phytoalexinen ermöglicht die Anwesenheit der Pilze im gleichen Habitat und außerdem ihre Pathogenität gegenüber einigen Pflanzen. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Sanguinarin, ein in Papaveraceen verbreitetes Benzophenanthridin-Alkaloid, besitzt in mikromolaren Konzentrationen ein breites antimikrobielles Spektrum (s. 1.3.3.2). Das *Papaver*-Pathogen *Dendryphion penicillatum* akkumuliert innerhalb weniger Stunden externes Sanguinarin im Mycel. Der biochemische Mechanismus der nachfolgenden Metabolisierung ist jedoch nicht bekannt [Cline und Coscia 1988].

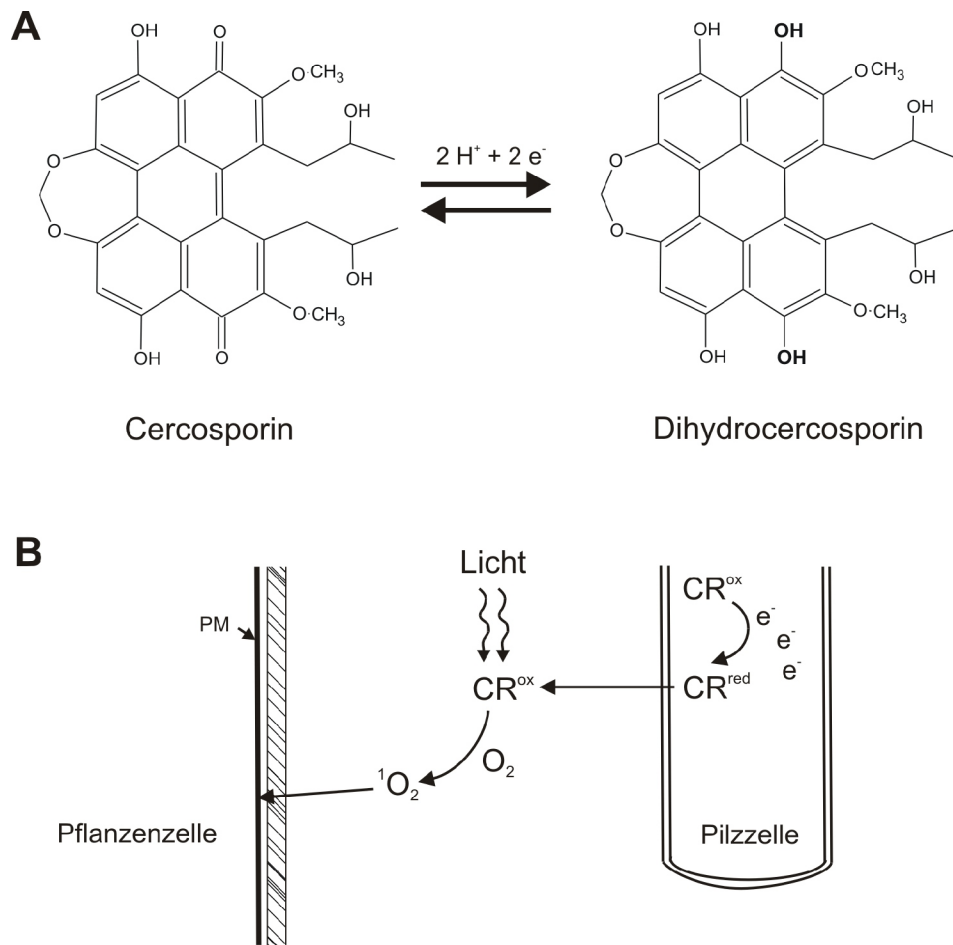
Ein wichtiger Resistenzmechanismus von Bakterien ist der rasche Efflux von antimikrobiellen Sekundärstoffen durch die Expression von MDR-Transportsystemen (multidrug resistance). Bevorzugte Substrate dieser Effluxpumpen sind hydrophobe Kationen, z. B. die Protoberberin-Alkaloide Berberin und Palmatin im Falle des NorA MDR-Transporters von *Staphylococcus aureus* [Hsieh *et al.* 1998]. Die an sich geringe antibiotische Aktivität der Protoberberine wird durch in der gleichen Pflanze gebildete Hemmstoffe des NorA-Transporters, u. a. 5'-Methoxyhydnocarpin, potenziert [Stermitz *et al.* 2000]. So schützt die Synthese von Berberin in Kombination mit 5'-Methoxyhydnocarpin *Berberis*-Arten effizient vor bakteriellen Infektionen.

**Tab. 1** Enzymatische Metabolisierung verschiedener Phytoalexine durch pathogene Pilze

Phytoalexin	Stoffgruppe und Vorkommen	Prinzip der Metabolisierung	Referenzen
<b>Avenacin A-1</b>	Triterpensaponin aus Hafer	Zuckerhydrolyse durch Avenacinase verschiedener Pilze	[Morrissey und Osbourn 1999]
<b><math>\alpha</math>-Tomatin</b>	Steroidsaponin aus Tomate	Zuckerhydrolyse durch Tomatinasen verschiedener Pilze	[Morrissey und Osbourn 1999]
<b><math>\alpha</math>-Chaconin</b>	Steroidsaponin aus Kartoffel	Zuckerhydrolyse durch $\alpha$ -Chaconinase versch. Pilze	[Morrissey und Osbourn 1999]
<b>Blausäure</b>	aus cyanogenen Pflanzen	Umwandlung zu Formamid durch Cyanid-Hydratasen versch. Pilze	[Fritsche 1988] [Osbourn 1996]
<b>Kieviton</b>	Isoflavonoid aus Leguminosen	Hydratation einer Doppelbindung durch <i>Fusarium solani</i>	[Morrissey und Osbourn 1999]
<b>Pisatin</b>	Isoflavonoid aus Leguminosen	Demethylierung durch induzierbare Cyt P-450 Monooxygenase von <i>Nectria haematococca</i>	[VanEtten <i>et al.</i> 1989] [Morrissey und Osbourn 1999]
<b>Medicarpin</b>	Isoflavonoid aus Leguminosen	Hydroxylierung durch <i>Colletotrichum coffeanum</i>	[Harborne 1995f]
<b>Camalexin</b>	Indolderivat aus Kreuzblütengewächsen	Hydroxylierung durch <i>Rhizoctonia solani</i>	[Morrissey und Osbourn 1999]
<b>Wyeron</b>	Furanoacetylen aus Saubohne	Hydrierung durch <i>Botrytis cinerea</i>	[Harborne 1995f]

#### 1.2.4 Metabolisierung von Pilz-Toxinen im Produktionsorganismus - das Beispiel Cercosporin

Die Resistenz gegen das Pilz-Toxin Cercosporin ist ein gut untersuchtes Modell für einen redox-basierten Entgiftungsvorgang. Verschiedene *Cercospora*-Arten verursachen nekrotische Schäden an Zuckerrüben, Mais, Sojabohnen, Tabak und anderen Nutzpflanzen [Daub und Ehrenshaft 2000]. Pathogenitätsfaktor ist das lipophile Polyketid Cercosporin, das als Photosensitizer wirkt. Durch Licht aktiviertes Cercosporin reagiert mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von reaktivem Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) und Superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) [Heiser *et al.* 1998], wobei  $^1\text{O}_2$  das überwiegend toxische Agens ist [Daub und Ehrenshaft 2000].



**Abb. 1** Reversible Reduktion von Cercosporin als Resistenzmechanismus in *Cercospora*

- A) chemische Struktur von Cercosporin und Dihydrocercosporin
- B) Cercosporin ( $CR^{ox}$ ) wird in den Pilzzellen reduziert und verbleibt als inaktives Derivat ( $CR^{red}$ ) im Cytosol. Ausgeschiedenes Cercosporin wird sofort reoxidiert. Das photoaktivierbare (oxidierte) Cercosporin reagiert nach Lichtaktivierung mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von Singulett-Sauerstoff ( ${}^1O_2$ ). Dieser führt durch Lipidperoxidation zu Membranschäden am Wirtsorganismus.  
 Schema nach Daub und Ehrenshaft [2000]; PM - Plasmamembran

Dieses verursacht über Lipidperoxidation [Cavallini *et al.* 1979] Schäden an Plasmamembranen [Gorinova *et al.* 1998], die zum Zelltod führen. Für Mikroorganismen, Pflanzen- und menschliche Tumorzellen sind bereits Cercosporin-Konzentrationen  $< 1 \mu M$  toxisch [Daub 1982, Daub 1987, Vandenbogaerde *et al.* 1998]. Infolge eines effektiven Resistenzmechanismus tolerieren *Cercospora*-Arten millimolare Konzentrationen an Cercosporin [Rollins *et al.* 1993]. Sie schützen sich vor ihrem eigenen Toxin durch dessen Reduktion (Abb. 1).

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß resistente Pilze Cercosporin in reduzierter Form, erkennbar an dessen grüner Fluoreszenz, im Cytoplasma der Hyphen speichern. Dieses wird nach Freisetzung und Diffusion von der Zelloberfläche spontan oxidiert und ist als rote Fluoreszenz im Außenmedium nachweisbar [Daub *et al.* 1992, Daub *et al.* 2000]. Generell zeigen reduzierte, d. h. Dihydro-Cercosporinderivate eine verminderte  $^1\text{O}_2$ -Produktion [Daub *et al.* 2000] und dadurch eine verringerte Lipidperoxidation [Leisman und Daub 1992].

Cercosporin-resistente *Cercospora*-Arten besitzen die Fähigkeit zur Reduktion dieses Toxins. Die gleichzeitige Inkubation mit Glutathion, Cystein bzw. Ascorbinsäure ermöglicht jedoch auch sensitiven Pilzen die Reduktion von Cercosporin [Daub *et al.* 1992].

Die Fähigkeit, Cercosporin als Dihydroderivat im Cytosol der Pilzzellen zu akkumulieren, bildet die Grundlage der Cercosporinresistenz. Vermutlich besitzen *Cercospora*-Arten Reduktasen, die Cercosporin in der reduzierten Form halten, bevor es die Zelle verläßt. Die Reduktion von Cercosporin ist jedoch nicht gekoppelt an die generelle Eigenschaft der Zellen, externe Elektronenakzeptoren, z. B. Tetrazoliumsalze, zu reduzieren [Jenns *et al.* 1995]. Dies spricht für die Existenz einer Cercosporin-spezifischen Reduktase.

Da auch reduziertes Cercosporin Singulett-Sauerstoff bildet, wenn auch in geringerem Maße [Daub *et al.* 2000], sind neben der Reduktion weitere Abwehrmechanismen für die volle Resistenz gegen Cercosporin erforderlich.

Bilski *et al.* [2000] vermuten eine Beteiligung von Pyridoxin und dessen Derivaten als Quencher von Singulett-Sauerstoff. Die Transformation Cercosporin-sensitiver Mutanten von *Cercospora nicotianae* mit den Genen *PDX1* bzw. *PDX2* führte zur Resistenz gegenüber Singulett-Sauerstoff [Ehrenshaft *et al.* 1998, Ehrenshaft und Daub 2001]. *PDX1* und *PDX2* sind an einem neuen Biosyntheseweg von Vitamin B<sub>6</sub> beteiligt [Ehrenshaft *et al.* 1999, Ehrenshaft und Daub 2001].

Das Gen *CRG1* (cercosporin resistance gene) kodiert einen putativen Transkriptionsfaktor [Chung *et al.* 2003] und ist in *Cercospora nicotianae* für die Resistenz gegenüber Cercosporin, nicht aber für die Resistenz gegenüber anderen Photosensitizern erforderlich [Chung *et al.* 1999].

Untersuchungen am eukaryotischen Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* führten zum Nachweis zweier Gene, die an der Resistenz gegenüber Singulett-Sauerstoff-produzierenden Photosensitizern beteiligt sind [Ververidis *et al.* 2001]: Dabei kodiert *CPD1* (cercosporin photosensitizer detoxification) eine putative membranassoziierte Reduktase mit hoher Sequenzhomologie zu FAD-abhängigen Pyridinnucleotid Reduktasen (FADPNR).

Neben der Reduktion ist auch der aktive Efflux von Cercosporin ein Mechanismus zur Ausbildung von Resistenz. Die Überexpression des aus *S. cerevisiae* bekannten MDR-Transporters Snq2b vermittelt Resistenz gegenüber mehreren Singulett-Sauerstoff-Produzenten, neben Cercosporin auch Methylenblau und Toluidinblau [Verweridis *et al.* 2001].

Ein in *Cercospora kikuchii* identifiziertes Protein (CFP, cercosporin facilitator protein) zeigt Ähnlichkeiten mit integralen Membran-Transportproteinen der major facilitator superfamily (MFS), die an der Resistenz von Bakterien und Pilzen gegenüber verschiedenen Antibiotika beteiligt sind. Callahan und Mitarbeiter [1999] vermuten, daß CFP einen Cercosporin-Transporter kodiert, welcher durch aktiven Export die intrazelluläre Cercosporinkonzentration minimiert.

Neben den *Cercospora*-Arten entwickelten auch einige Bakterien einen Resistenzmechanismus gegenüber dem Toxin Cercosporin. Mitchell und Mitarbeiter [2002] isolierten Cercosporin-abbauende Bakterien aus vier verschiedenen Gattungen und identifizierten das Prinzip der Entgiftung durch *Xanthomonas campestris*. Dabei stellten sie fest, daß diese Bakterien exogenes Cercosporin innerhalb weniger Stunden aufnehmen und vermutlich durch eine Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenase zu Xanosporsäure umwandeln. Xanosporsäure und ihr stabileres Lactonderivat sind zwar noch lichtempfindliche Verbindungen, erwiesen sich aber als nicht mehr toxisch gegenüber Cercosporin-sensitiven Pilzen und Pflanzengeweben.

### 1.3 Benzophenanthridine - Toxine von *Eschscholzia californica*

*Eschscholzia californica* Cham. (Papaveraceae), auch Kalifornischer Mohn oder Goldmohn genannt, ist im westlichen Nordamerika beheimatet. Als Zierpflanze wurde *E. californica* im 19. Jahrhundert nach Europa eingeführt [Guédon *et al.* 1990]. Der botanische Name wurde 1820 von Adelbert von Chamisso zu Ehren von Johann Friedrich Gustav v. Eschscholz (1793-1831) vergeben [Clark 2000, Geppert 2004]. Seit 1903 ist *E. californica* ein nationales Symbol des Staates Kalifornien [United States National Arboretum 2004].

Die traditionell von Indianern genutzte Heilpflanze enthält u. a. Benzophenanthridin-Alkaloide. Etwa 80, hauptsächlich in Papaveraceen vorkommende Benzophenanthridine sind bekannt [Krane *et al.* 1984]. Um die Biosynthese dieser Alkaloide zu studieren, wurden aus Papaveraceen mehrere Zellkultursysteme entwickelt, welche nach Kontakt mit biotischen und abiotischen Elicitoren verstärkt Benzophenanthridine produzieren, u. a. *Sanguinaria canadensis* [Cline *et al.* 1993], *Papaver somniferum* [Facchini *et al.* 1996] und *Eschscholzia californica* [Schumacher *et al.* 1987].

Eine Übersicht der in *E. californica* identifizierten Benzophenanthridine ist in Tab. 2 zusammengestellt.

**Tab. 2** Übersicht der in *Eschscholzia californica* identifizierten Benzo[c]phenanthridine  
Die Molmassen wurden aus [Krane *et al.* 1984] sowie [Tanahashi und Zenk 1990b] entnommen.

Benzo[c]phenanthridine	M (g/mol)	Vorkommen in Pflanzen	Vorkommen in Zellkulturen
<b>Norsanguinarin</b>	317	[Jain <i>et al.</i> 1996]	[Ikuta <i>et al.</i> 1974]
<b>Sanguinarin</b>	332	[Slavík u. Slavíková 1955] [Preininger 1986] [Tomè <i>et al.</i> 1999]	[Ikuta <i>et al.</i> 1974] [Schumacher <i>et al.</i> 1987] [Collinge u. Brodelius 1989] [Tanahashi u. Zenk 1990b] [Gundlach 1992]
<b>Dihydrosanguinarin</b>	333	[Berlin <i>et al.</i> 1983] [Preininger 1986]	[Ikuta <i>et al.</i> 1974] [Berlin <i>et al.</i> 1983] [Tanahashi u. Zenk 1990b] [Gundlach 1992]
<b>Oxysanguinarin</b>	347		[Ikuta <i>et al.</i> 1974]
<b>10-Hydroxysanguinarin</b>	348		[Tanahashi u. Zenk 1990b]
<b>Chelerythrin</b>	348	[Slavík u. Slavíková 1955] [Preininger 1986] [Tomè <i>et al.</i> 1999]	[Schumacher <i>et al.</i> 1987] [Collinge u. Brodelius 1989] [Tanahashi u. Zenk 1990b]
<b>10-Hydroxydihydrosanguinarin</b>	349		[Tanahashi u. Zenk 1990b]
<b>Dihydrochelerythrin</b>	349	[Berlin <i>et al.</i> 1983] [Preininger 1986]	[Berlin <i>et al.</i> 1983] [Tanahashi u. Zenk 1990b]
<b>Chelirubin</b>	362	[Slavík u. Slavíková 1955] [Preininger 1986]	[Ikuta <i>et al.</i> 1974] [Schumacher <i>et al.</i> 1987] [Tanahashi u. Zenk 1990b] [Gundlach 1992]
<b>Dihydrochelirubin</b>	363	[Berlin <i>et al.</i> 1983] [Preininger 1986]	[Berlin <i>et al.</i> 1983] [Tanahashi u. Zenk 1990b] [Gundlach 1992]
<b>10-Hydroxychelerythrin</b>	364		[Tanahashi u. Zenk 1990b]
<b>10-Hydroxydihydrochelerythrin</b>	365		[Tanahashi u. Zenk 1990b]
<b>12-Hydroxychelirubin</b>	378		[Tanahashi u. Zenk 1990b] [Gundlach 1992]
<b>Chelilutin</b>	378	[Slavík u. Slavíková 1955] [Preininger 1986]	[Schumacher <i>et al.</i> 1987] [Tanahashi u. Zenk 1990b]
<b>12-Hydroxydihydrochelirubin</b>	379		[Tanahashi u. Zenk 1990b] [Gundlach 1992]
<b>Dihydrochelilutin</b>	379		[Tanahashi u. Zenk 1990b]
<b>Macarpin</b>	392		[Schumacher <i>et al.</i> 1987] [Collinge u. Brodelius 1989] [Tanahashi u. Zenk 1990b] [Gundlach 1992]
<b>Dihydromacarpin</b>	393	[Berlin <i>et al.</i> 1983] [Preininger 1986]	[Berlin <i>et al.</i> 1983] [Schumacher <i>et al.</i> 1987] [Tanahashi u. Zenk 1990b] [Gundlach 1992]

### 1.3.1 Induktion der Synthese von Benzophenanthridinen in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*

Die Bildung von Benzophenanthridin-Alkaloiden durch Zellsuspensionen von *E. californica* ist durch die als pflanzliche Streßhormone bekannten Octadecanoide und verschiedene biotische und abiotische Elicitoren induzierbar, u. a. durch:

1. Octadecanoide und ähnliche Verbindungen:
  - Methyljasmonat [Gundlach *et al.* 1992], 12-Oxophytodiensäure sowie synthetische Jasmonsäureanaloge [Blechert *et al.* 1995, Haider *et al.* 2000]; Precursor ist Linolensäure (18:3);
  - Dihydrojasmonsäure [Gundlach und Zenk 1998]; Precursor ist Linolsäure (18:2);
  - Coronatin [Haider *et al.* 2000], ein Polyketidtoxin aus *Pseudomonas syringae*; besitzt strukturelle Ähnlichkeiten mit 12-Oxophytodiensäure [Weiler 1997];
  - Phytoprostane: durch ROS induzierte, nichtenzymatisch gebildete C18-Isoprostanoide [Thoma *et al.* 2004];
2. Pilze und daraus abgeleitete Pilzpräparationen: *Penicillium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Verticillium dahliae* [Schumacher *et al.* 1987, Byun und Pedersen 1991];
3. Hyperosmose [Berlin *et al.* 1983, Färber *et al.* 2003].

Die Auslösung der Benzophenanthridin-Biosynthese durch Kontakt mit Pilzelicitoren wurde anhand einer Glycoproteinfraktion aus Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) untersucht. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe sprechen dafür, daß hierbei zwei getrennte Signalwege zur Induktion der Biosyntheseenzyme führen:

1. Niedrige Elicitorkonzentrationen wirken über die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> und die Bildung des Signalmoleküls Lysophosphatidylcholin, welches seinerseits einen Efflux vakuolärer Protonen auslöst [Roos *et al.* 1999, Viehweger *et al.* 2002]. Der dadurch erzeugte transiente pH-Shift im Cytoplasma ist ein essentieller Schritt zur Auslösung der Alkaloidsynthese [Roos *et al.* 1998, Küppers 2001].
2. Hohe Konzentrationen des Glycoprotein-Elicitors führen zu einem Anstieg von Jasmonat [Mueller *et al.* 1993, Färber *et al.* 2003], dessen Induktorwirkung auf Enzyme der Alkaloidbiosynthese gut bekannt ist [Blechert *et al.* 1995, Pauli und Kutchan 1998] und keine pH-Shifts erfordert [Färber *et al.* 2003].

Während der jasmonatabhängige Signalweg mit der Auslösung der Hypersensitivitätsreaktion gekoppelt ist, z. B. Browning der Zellkultur, sind diese ubiquitären Reaktionen am pH-abhängigen Signalweg nicht beteiligt [Roos *et al.* 1998].

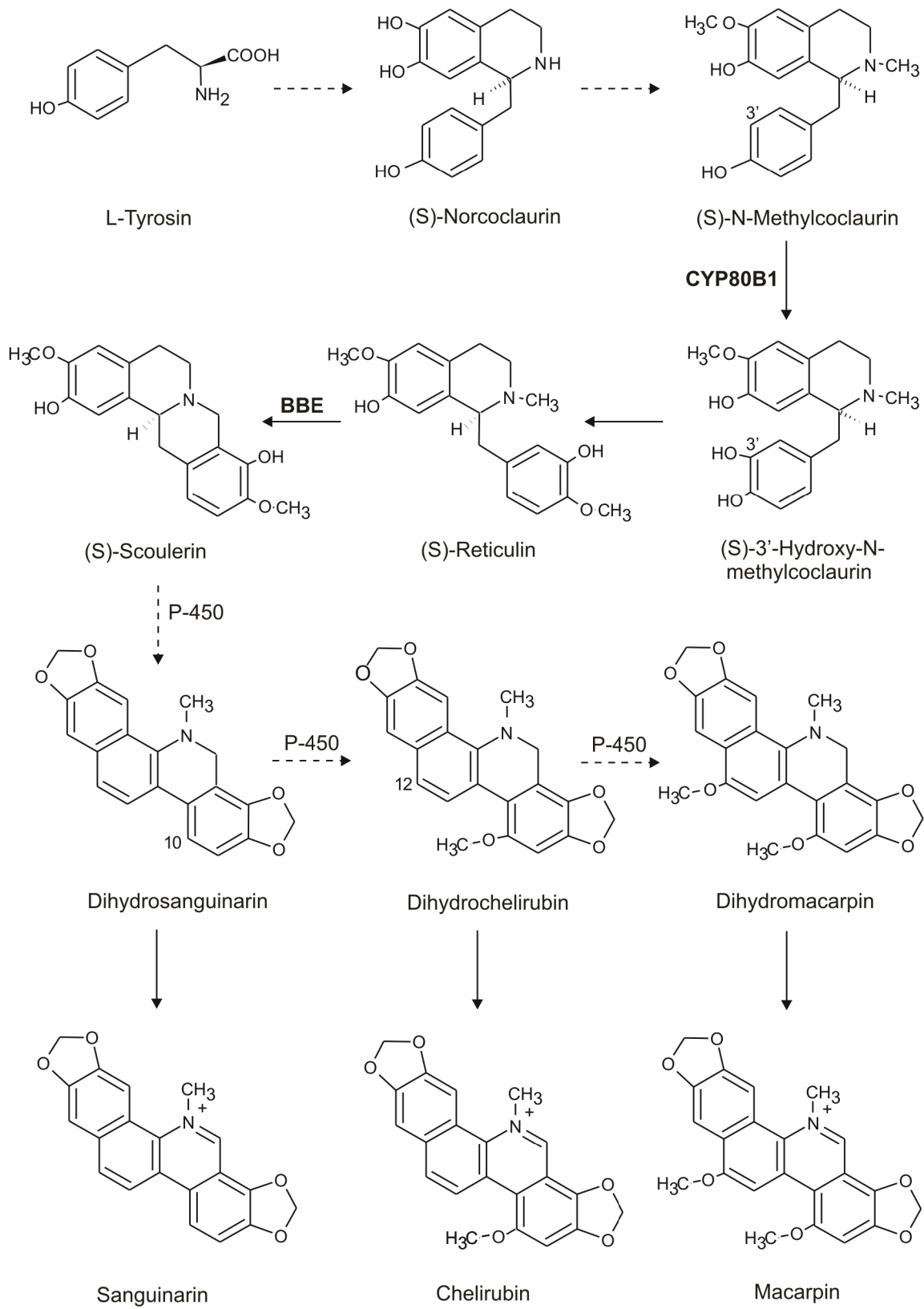
### 1.3.2 Biosynthese der Benzo[c]phenanthridin-Alkaloide

Die Bildung von Benzo[c]phenanthridinen erfolgt über einen komplexen Syntheseweg aus dem Precursor L-Tyrosin (Abb. 2 und 3). Eine vollständige Übersicht der einzelnen Schritte gibt Zenk [1995]. **(S)-Reticulin** stellt einen wichtigen Verzweigungspunkt innerhalb der Biosynthese verschiedener Isochinolin-Alkaloide, z. B. des Morphins, dar. Der Ringschluß zum Protoberberin-Grundgerüst erfolgt durch das Berberinbrückenenzym (BBE, EC 1.21.3.3). Es katalysiert die stereospezifische Umwandlung der N-Methylgruppe des (S)-Reticulins in die Methylengruppe des **(S)-Scoulerins** [Kutchan und Dittrich 1995]. Auf der Stufe des (S)-Scoulerins zweigt die Biosynthese des Chelerythrins und der Protoberberine, z. B. Berberin, ab.

Takao und Mitarbeiter [1983] demonstrierten durch In-vivo-Studien an *Macleaya cordata*, daß **Protopin** sowie **Allocryptopin** die Vorläufer der Benzophenanthridine Sanguinarin bzw. Chelerythrin sind (Abb. 3). Durch Hydroxylierung von Protopin, katalysiert durch die Protopin-6-Hydroxylase (EC 1.14.13.55), wird die Bildung des Benzophenanthridin-Grundgerüsts eingeleitet. Für die Umwandlung von 6-Hydroxyprotopin zu Dihydro-sanguinarin wird eine spontane intramolekulare Umlagerung angenommen (Mechanismus s. Moss [2004b]). Durch je zwei hochspezifische Hydroxylierungs- und Methylierungsschritte an C-10 und C-12 des Dihydro-sanguinarins entsteht Dihydromacarpin [De-Eknamkul *et al.* 1992, Kammerer *et al.* 1994]. Letzter Schritt der Biosynthese ist die Oxidation der Dihydrobenzophenanthridine durch die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (EC 1.5.3.12). Dieses Enzym katalysiert die Oxidation der Dihydrobenzophenanthridine durch molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Die cytosolische Oxidase wurde aus Zellsuspensionen von *E. californica* [Schumacher und Zenk 1988] sowie *Sanguinaria canadensis* [Arakawa *et al.* 1992] gereinigt und charakterisiert.

Der komplexe Biosyntheseweg der Benzo[c]phenanthridine beinhaltet also sowohl cytosolische als auch membrangebundene Enzyme. 9 Enzyme katalysieren Reaktionen mit molekularem Sauerstoff. Alle 8 membrangebundenen Enzyme, die Cytochrom P-450-Monooxygenasen sowie das Berberinbrückenenzym, sind durch Elicitorbehandlung (Hefe-elicitor, Methyljasmonat, Barbiturate) induzierbar, nicht jedoch die löslichen Enzyme [Tanahashi und Zenk 1990a, De-Eknamkul *et al.* 1992, Kammerer *et al.* 1994, Blechert *et al.* 1995, Haider *et al.* 1997, Pauli und Kutchan 1998].

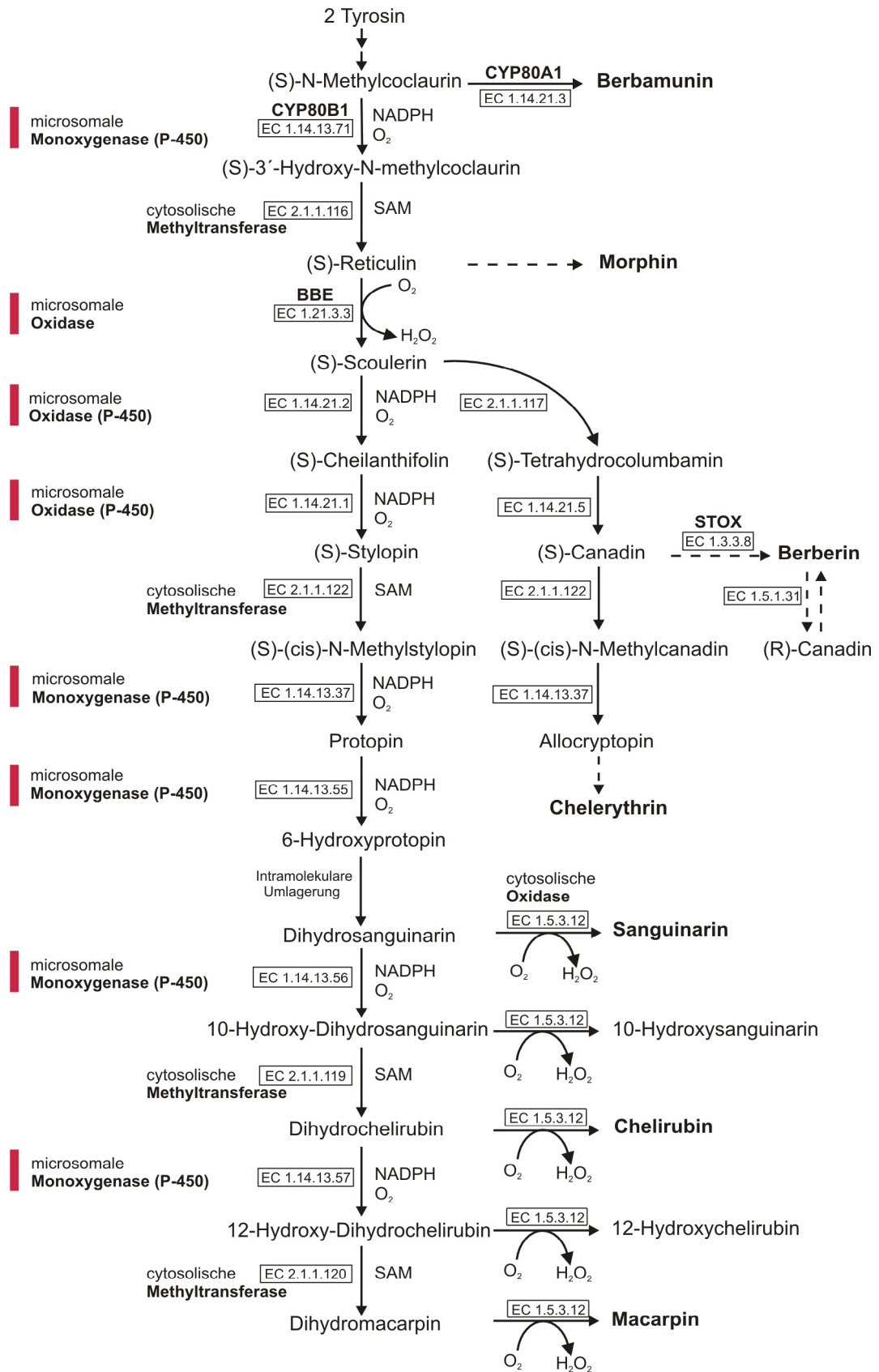




**Abb. 2** Verkürzte Darstellung der Biosynthese der Benzo[*c*]phenanthridine  
 Schema nach Haider *et al.* [1997]

**Abb. 3** Schematische Darstellung der Benzophenanthridin-Biosynthese mit Verzweigungspunkten innerhalb der Isochinolinalkaloid-Synthese

Schema nach Zenk [1995] und den dort zitierten Referenzen sowie Blechert *et al.* [1995], Haider *et al.* [1997], Pauli und Kutchan [1998], IUBMB Enzyme Nomenclature: Moss [2004a]; rot gekennzeichnet sind die durch Elicitorbehandlung induzierbaren Enzyme der Benzophenanthridin-Biosynthese.



**Abb. 3** Schematische Darstellung der Benzophenanthridin-Biosynthese mit Verzweigungspunkten innerhalb der Isochinolinalkaloid-Synthese

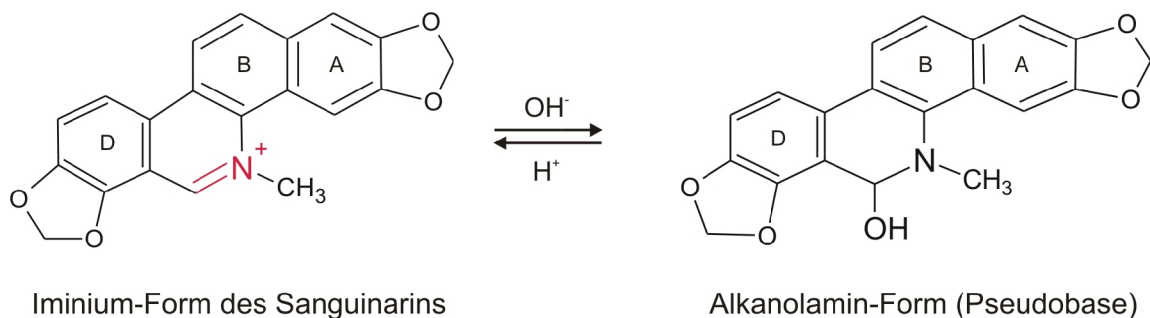
### 1.3.3 Zur Pharmakologie der Benzophenanthridin-Alkaloide

#### 1.3.3.1 Molekulare Targets der Benzophenanthridine

Grundlage der biochemischen Reaktivität der Benzophenanthridine ist das planare polycyclische Ringsystem mit der positiven Ladung des quaternären Stickstoffs. Diese Struktur verleiht den Alkaloiden den Charakter hydrophober Kationen. Die Toxizität der Alkaloide beruht auf ihrem Einfluß auf verschiedene biochemische Reaktionen:

1. Benzophenanthridine **interkalieren** in doppelsträngige DNA und RNA, bevorzugt in GC-reiche Sequenzen [Bajaj *et al.* 1990, Faddeeva und Beliaeva 1997, Schmeller *et al.* 1997, Sen und Maiti 2002]. Die Bindungskonstanten für Sanguinarin an dsDNA variieren in Abhängigkeit der  $\text{Na}^+$ -Ionenstärke von  $1,8 \times 10^6$  bis  $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (bei  $20^\circ\text{C}$ ) [Sen *et al.* 1996]. Dabei wird Sanguinarin als Iminiumion und nicht als Alkanolamin gebunden (Abb. 4, [Maiti *et al.* 2002]).

Die Interkalation der Alkaloide führt zu Strukturveränderungen der Nucleinsäuren und dadurch zu Störungen der Transkription und Replikation. Einige Benzophenanthridine hemmen die Aktivität der reversen Transkriptase: Durch Bindung der Alkaloide an AT-Basenpaare der template-primer-Doppelstränge wird die Synthese der cDNA verhindert [Kakiuchi *et al.* 1987]. Die Komplexbildung von Alkaloid und DNA ist ebenfalls für die Hemmung der DNA Polymerase-Aktivität verantwortlich [Schmeller *et al.* 1997].



**Abb. 4** Chemische Strukturen der Iminium- sowie Alkanolamin-Form des Sanguinarins  
 Schema nach Bajaj *et al.* [1990]

2. Die **Membrantoxizität** der Benzophenanthridine ergibt sich aus der Tatsache, daß durch das Membranpotential (innen negativ) eine Triebkraft zur Anlagerung bzw. Aufnahme hydrophober Kationen existiert - ähnlich wie beim Berberin - während andererseits der hydrophobe Molekülteil mit der Lipidphase interagiert. Damit entsteht eine Tendenz zur Störung der Membranpermeabilität und zur Depolarisation. Dabei spielt allerdings auch die Interaktion mit membranständigen SH-haltigen Enzymen (s. u.) eine Rolle, die beim Berberin nicht vorkommt [Ulrichová *et al.* 1984].

Jans [1973] demonstrierte die toxischen Effekte von Sanguinarin und Chelerythrin auf die Membranintegrität isolierter Vakuolen von *Chelidonium majus* sowie *Saccharomyces cerevisiae*. Die Inkubation von Erythrocyten mit mikromolaren Konzentrationen an Sanguinarin bewirkte ebenfalls Membranstabilität [Schmeller *et al.* 1997]. Berberin war in beiden Untersuchungen inaktiv. Die Inkubation von kultivierten Gingiva-Epithelzellen mit 128  $\mu\text{M}$  Sanguinarin führte durch membrantoxische Effekte des Alkaloids zu einem meßbaren Anstieg an extrazellulärer Lactatdehydrogenase-Aktivität [Babich *et al.* 1996].

Durch Depolarisation von Membranen wirken Benzophenanthridine als **Entkoppler** der ATP-Synthese in Mitochondrien [Faddeeva und Beliaeva 1997] und Chloroplasten ( $\text{IC}_{50}\text{Sang } 9 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}\text{Chel } 25 \mu\text{M}$ ) [Vallejos 1973].

3. Die Interaktion der quarternären Alkaloide mit anionischen Bindungsstellen führt u. a. zur Hemmung der **Acetylcholinesterase** und der **Butyrylcholinesterase** [Ulrichová *et al.* 1983a+b, Schmeller *et al.* 1997].

4. Die Reaktion der quarternären Iminiumionen mit SH-Gruppen ist verantwortlich für die Hemmung von SH-abhängigen Enzymen. So wird die  **$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**, isoliert aus dem Myocard von Meerschweinchen, durch Sanguinarin in mikromolaren Konzentrationen gehemmt ( $\text{IC}_{50} 6 \mu\text{M}$ ) [Seifen *et al.* 1979]. Transformierte Hefezellen, welche die Säugetier- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase exprimieren, reagieren auf den Zusatz von Sanguinarin mit dem Verlust von cytosolischem Kalium ( $\text{EC}_{50} 29 \mu\text{M}$ ) [Scheiner-Bobis 2001].

Für die Bindung von Benzophenanthridinen an das **Cytoskelett** wird eine Interaktion der Iminiumstruktur mit SH-Gruppen im Tubulinmolekül (Pseudobasenbildung) diskutiert. Die Hemmung der Polymerisation von Tubulin wurde für Sanguinarin und Chelerythrin bestimmt:  $\text{IC}_{50}\text{Sang } 13 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}\text{Chel } 37 \mu\text{M}$  [Wolff und Knipping 1993].

Die Bindung der Mitosehemmstoffe Colchicin und Podophyllotoxin an Tubulin wurde ebenfalls effektiver durch Sanguinarin im Vergleich zu Chelerythrin inhibiert [Wolff und Knipling 1993].

Sanguinarin hemmt, wie auch Aspirin und Glucocorticoide, die Aktivierung des **Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B** [Chaturvedi *et al.* 1997]. Dieser reguliert die Genexpression verschiedener Cytokine, die u. a. an entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Die inhibitorische Wirkung von Sanguinarin wird durch reduzierende Agentien aufgehoben. Dies spricht für eine Beteiligung von Sulfhydrylgruppen an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Die strukturellen Analoga Chelerythrin sowie Berberin zeigten keinen Effekt. Antiphlogistische Eigenschaften der Benzophenanthridine wurden durch andere Arbeitsgruppen bestätigt [Lenfeld *et al.* 1981, Vavreckova *et al.* 1996a]. Vavreckova und Mitarbeiter vermuten eine spezifische Enzyminteraktion von Sanguinarin und Chelerythrin, die zur Hemmung der 5- sowie 12-**Lipoxygenase** führt.

Zahlreiche Studien belegen die **Cytotoxizität** von Benzophenanthridinen auf zellulärer Ebene. Dabei scheint eine noch unverstandene Umsetzung mit GSH eine wesentliche Rolle zu spielen. So hemmen Chelerythrin (IC<sub>50</sub> 0,53  $\mu$ M) [Herbert *et al.* 1990] sowie Sanguinarin (IC<sub>50</sub> 0,9-3,3  $\mu$ M) [Debiton *et al.* 2003] das Wachstum von Tumorzellen und Keratinocyten (IC<sub>50</sub>Sang 0,2  $\mu$ M) [Vavreckova *et al.* 1996b]. Debiton und Mitarbeiter [2003] zeigten, daß die Inkubation von Tumorzellen mit Sanguinarin zur Absenkung des intrazellulären Glutathions führt und nachfolgend Apoptose induziert. Sie demonstrierten indirekt, daß Sanguinarin mit reduziertem GSH reagiert, identifizierten jedoch keine Reaktionsprodukte. Sie vermuten eine direkte Interaktion des Iminiumions mit GSH unter Bildung einer Pseudobase.

Die intraperitoneale Applikation von Sanguinarin (10 mg/kg) führt in Mäusen zu einem signifikanten Abfall von reduziertem Glutathion in der Leber verbunden mit einer Verringerung von Cytochrom P-450-Enzymaktivitäten [Williams *et al.* 2000]. Die Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren, einem Induktor von Cyt P-450-Enzymen, senkt die toxischen Effekte des Sanguinarins. Vermutlich bindet das elektrophile Alkaloid an Cyt P-450-Enzyme und wird dadurch entgiftet. Modriansky *et al.* [2001] bestätigten eine Interaktion von Benzophenanthridinen mit **Cytochrom P-450-Enzymen**. An humanen Lebermikrosomen demonstrierten sie inhibitorische Wirkungen von Sanguinarin und Chelerythrin auf die Cyt P-450-Isoenzyme CYP1A (IC<sub>50</sub>Sang 11  $\mu$ M, IC<sub>50</sub>Chel 16  $\mu$ M) sowie CYP3A4 (IC<sub>50</sub>Sang 25  $\mu$ M, IC<sub>50</sub>Chel 30  $\mu$ M).

5. Einige Benzophenanthridine hemmen kompetitiv die Bindung von Vasopressin, einem Peptidhormon, an V1-Rezeptoren. Untersuchungen von Granger und Mitarbeitern [1992] an Rattenleber-Plasmamembranen ergaben  $IC_{50}$ -Werte von 26  $\mu$ M bzw. 23  $\mu$ M für Sanguinarin bzw. Chelerythrin. Der Aktivitätsvergleich mit anderen Benzophenanthridinen veranschaulichte, daß die Position der Alkoxygruppen sowie der quarternäre Stickstoff essentiell für die V1-Affinität sind.

Die vielfältigen zellulären Angriffspunkte der Benzophenanthridine bedingen u. a. ihre Wirkung gegenüber Bakterien und Pilzen.

#### 1.3.3.2 Antimikrobielle Aktivität der Benzophenanthridine

Die antimikrobielle Wirkung von Benzophenanthridinen gegenüber Gram-positiven und -negativen Bakterien [Johnson *et al.* 1952, Vichkanova *et al.* 1969, Tolkachev und Vichkanova 1978, Dzink und Socransky 1985] sowie Pilzen [Vichkanova *et al.* 1969, Vichkanova und Adgina 1971, Tolkachev und Vichkanova 1978, Cline und Coscia 1988] wurde durch eine Vielzahl von In-vitro-Tests belegt. In-vivo-Untersuchungen an mit Mehltau infizierten Rosen bewiesen signifikant fungizide Eigenschaften eines aus *Macleaya cordata* isolierten Benzophenanthridin-Extraktes [Newman *et al.* 1999].

Ein Vergleich der Aktivität verschiedener Benzophenanthridine führte zur Schlußfolgerung, daß die antimikrobielle Wirkung mit der Reaktivität gegenüber nucleophilen Agenzien korreliert. Substituenten am Benzophenanthridin-Grundgerüst beeinflussen die Elektronendichte am aktiven Zentrum und damit die Reaktivität der Alkaloide. Dies erklärt die erhöhte Toxizität von Sanguinarin und Chelerythrin im Vergleich zu Chelirubin gegenüber *Candida albicans*. Die antibakterielle Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* sinkt in der Reihenfolge Sanguinarin > Chelerythrin > Chelirubin > Berberin ([Tolkachev und Vichkanova 1978], s. auch 1.2.3).

Medizinische Verwendung findet die antibakterielle Wirkung der Benzophenanthridine in der Oralhygiene. Dabei werden Extrakte aus dem Rhizom von *Sanguinaria canadensis* eingesetzt. Dzink und Socransky [1985] demonstrierten in umfangreichen Studien die In-vitro-Aktivität von Sanguinarin gegenüber oralen Bakterienstämmen (MIC 1 - 16  $\mu$ M).

#### 1.4 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen war die Beobachtung, daß Suspensionen intakter Zellen von *Eschscholzia californica* zugesetztes Sanguinarin rasch aus dem Medium aufnehmen und umwandeln. Dies führte jedoch nicht zu einer Anhäufung des Benzophenanthridins in der Zelle (Färber, Weiß u. Roos; unveröffentlicht). Damit eröffnete sich eine Möglichkeit, einen noch unbekanntem Mechanismus des Schutzes der produzierenden Zelle vor ihrem eigenen Toxin aufzufinden und die Kontrolle der Alkaloidbiosynthese auf zellulärer Ebene besser zu verstehen.

Die Hauptziele der vorliegenden Arbeit waren deshalb:

1. die Aufklärung der Spezifität der Alkaloidaufnahme und ihre Kopplung mit dem Metabolismus;
2. die Suche nach der vermuteten Sanguinarin-Reduktase, ihre Isolation, Reinigung und Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Kultivierung der Zellsuspensionen

Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica* wurden in einem Nährmedium nach Linsmaier und Skoog [1965] mit den Phytohormonen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Naphthyl-essigsäure (je 1  $\mu\text{M}$ ) kultiviert. Nach einem 9-Tage-Wachstumszyklus erfolgte das Überimpfen in frisches Nährmedium. Hierzu wurden 112 ml Nährlösung mit 38 ml Zellsuspension versetzt und in 300-ml-Erlenmeyerkolben bei 23 - 24 °C auf einer Rundschüttelmaschine (Novotron AK 85, Infors, Bottmingen, Schweiz; 100 rpm) unter Dauerlicht (ca. 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) inkubiert.

### 2.2 Alkaloidbildung nach Elicitorbehandlung

Zellen aus 5 Tage alten Suspensionen wurden unter sterilen Bedingungen abgesiebt, mit phosphatfreier Nährlösung (NL-P 100 %) gewaschen und in NL-P resuspendiert (Zelldichte ca. 60 mg FM/ml). 100 ml Suspension wurden in 200-ml-Erlenmeyerkolben mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hefeelicitor [Schumacher *et al.* 1987] auf einer Rundschüttelmaschine (Novotron AK 85, Infors, Bottmingen, Schweiz; 100 rpm) inkubiert und nach den angegebenen Zeiten extrahiert (EtAc, MeOH [Villegas *et al.* 1999], s. 2.5.1.1). Für die Analyse der Alkaloidmuster nach 24-stündiger Elicitierung wurden 150 ml Suspension in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Elicitor inkubiert und davon 120 ml nach 2.5.1.1 extrahiert.

### 2.3 Inkubation von Zellsuspensionen mit Benzophenanthridinen

Zellen aus 5 - 6 Tage alten Suspensionen wurden unter sterilen Bedingungen abgesiebt, mit phosphatfreier Nährlösung (NL-P 100 %) gewaschen und in NL-P resuspendiert (Zelldichte ca. 80 mg FM/ml). Jeweils 12 ml der vorbehandelten Zellsuspension wurden in 25-ml-Erlenmeyerkolben mit jeweils 13  $\mu\text{M}$  Alkaloid (Sanguinarin, Chelerythrin, isolierte Alkaloidmischung s. 2.5.1.3, Berberin) auf einer Rundschüttelmaschine (KS 500, IKA-Labortechnik, Staufen, BRD) inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden je 2 ml Proben in Zentrifugengläser (auf Eis) pipettiert und bei 4 °C und 5040  $\times$  g zentrifugiert (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Osterode, BRD; Rotor Nr. 11 133, 5500 rpm, 10 min). Zur vollständigen Abtrennung der Zellen folgte eine zweite Zentrifugation in Reaktionsgefäßen bei 16 300  $\times$  g (3K12, Rotor Nr. 12 153, 13 000 rpm, 15 min). Die Alkaloidkonzentrationen der Überstände wurden (ohne Zusatz von Extraktionsmittel) am Fluorimeter bestimmt (s. 2.4.1). In einigen Experimenten (s. Abb. 10) wurden die Alkaloidgehalte in 500  $\mu\text{l}$  Suspension nach Extraktion mit MeOH/HCl bestimmt (s. 2.4.2).

Für HPLC-Analysen wurden jeweils 17 ml der vorbehandelten Zellsuspension in 50-ml-Erlenmeyerkolben auf einer Rundschüttelmaschine mit den angegebenen Alkaloidkonzentrationen inkubiert. Auf Grund des lipophilen Charakters der Dihydroalkaloide war der Zusatz von Methanol (Endkonzentration 2 %, s. 2.6) erforderlich. Nach den angegebenen Zeiten wurden 5 ml Suspension entnommen, die Alkaloide extrahiert (EtAc, MeOH [Villegas *et al.* 1999], s. 2.5.1.2) und quantifiziert (s. 2.5.2).

## 2.4 Fluorimetrische Quantifizierung der Benzophenanthridine

### 2.4.1 Fluorimeter

Grundlage der Fluoreszenzmessung bildete die Bestimmung optimaler Exzitations- und Emissionswellenlängen für die einzelnen Alkaloide (Tab. 3). Dazu wurden am Spektrofluorophotometer RF-5000 (Shimadzu, Kyoto, Japan) Exzitations- und Emissionsspektren methanolischer Lösungen der Alkaloide bzw. eines MeOH/HCl-Extraktes (vgl. 2.4.2) aus elicierten Suspensionen aufgenommen.

**Tab. 3** Exzitations- und Emissionsmaxima verschiedener Benzophenanthridin-Alkaloide

	Ex	Em		Ex	Em
Sanguinarin	490	580	Dihydrosanguinarin*	340	460
Chelerythrin	450	555	Dihydrochelerythrin*	335	465
Berberin (strukturverwandtes Alkaloid)	450	535			
isolierte Alkaloidmischung**	480	580	reduzierte Alkaloidmischung*	350	470
Alkaloidextrakt einer elicierten Zellkultur	480	570			

\* Herstellung durch Reduktion quarternärer Benzophenanthridine mit Natriumborhydrid (s. 2.6)

\*\* s. 2.5.1.3

Die Fluoreszenz der aus 2.3 gewonnenen Überstände wurden bei folgenden Einstellungen vermessen: Sanguinarin Ex  $485 \pm 5$ , Em  $580 \pm 20$ ; Chelerythrin und Berberin Ex  $450 \pm 10$ , Em  $540 \pm 20$ ; Alkaloidmischung Ex  $485 \pm 10$ , Em  $580 \pm 20$ . Die Umrechnung der Fluoreszenzwerte in die entsprechenden Alkaloidkonzentrationen erfolgte durch vorher erstellte Eichkurven.

## 2.4.2 Fluoreszenzreader

500  $\mu$ l Zellsuspension (s. 2.3) wurden mit 500  $\mu$ l Extraktionsmittel (36 mM HCl in MeOH) versetzt, für 20 min bei 40 °C im Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg, BRD) inkubiert und nachfolgend die Zellbestandteile bei 16 300  $\times$  g abzentrifugiert (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Osterode, BRD; Rotor Nr. 12 153, 13 000 rpm, 15 min). Auf eine Mikrotiterplatte wurden 4  $\times$  100  $\mu$ l extrahierter Alkaloidlösung pipettiert und am Fluoreszenzreader Fluorolite™ 1000 (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei folgenden Einstellungen vermessen: Filterkombination Ex 490  $\pm$  20, Em 570  $\pm$  30, Lampenspannung 7 Volt. Zur Umrechnung der gemittelten Fluoreszenzwerte in Alkaloidkonzentrationen dienten mit Sanguinarin erstellte Eichkurven.

## 2.5 HPLC von Benzophenanthridinen

### 2.5.1 Extraktion aus Zellsuspensionen

#### 2.5.1.1 Experimente zur Alkaloidbildung

Die nach 2.2 elicitierten Zellsuspensionen wurden durch Absieben getrennt in Filtrat und Zellüberstand. (Da Benzophenanthridin-Alkaloide an Cellulose binden, war das Abfiltrieren durch Papierfilter ungeeignet.) Grundlage für die Extraktion bildete eine Methode von Villegas *et al.* [1999].

Die **Zellen** wurden mehrmals mit Aqua demin. gespült und die anhaftende Flüssigkeit durch vorsichtiges Ausdrücken entfernt. Nachfolgend wurden die Zellen mit MeOH (grad. grade) in einem Verhältnis von 1 g Zellen : 4 g MeOH bei 40 °C am Rotationsverdampfer LABO ROTAS 300 (resona technics, Gossau, Schweiz) ohne angelegtes Vakuum für 20 min extrahiert. Nach dem Abkühlen wurden die Zellfragmente bei 5000  $\times$  g (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Osterode, BRD; Rotor Nr. 11 133, 5500 rpm, 20 min) abzentrifugiert. Der mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete Überstand wurde bei 60 °C am Rotationsverdampfer eingedampft und der Rückstand in 2 ml MeOH (grad. grade) gelöst.

Das **Medium** der elicitierten Zellsuspensionen wurde durch Zusatz von NaOH auf pH 9,0 eingestellt. Nach mehrmaliger Extraktion mit Ethylacetat (3  $\times$  20 ml) wurden die vereinigten Extrakte mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bei 40 °C am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol (grad. grade) aufgenommen.

Die Extrakte aus Zellen und Filtrat wurden durch HPLC/MS-Untersuchungen analysiert und quantifiziert (s. 2.5.2).

### 2.5.1.2 Experimente zur Metabolisierung extern zugesetzter Alkaloide

Die aus 2.3 entnommenen Suspensionsproben wurden durch ein Glasfaser Mikrofilter GF/F (Whatman, Maidstone, UK), welches auf den Innendurchmesser einer 5 ml-Spritze angepaßt war, in Zellpellet und Medium getrennt.

Das **Zellpellet** wurde in einem Verhältnis von 1 : 4 (w/w) in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit Methanol (grad. grade) versetzt, 20 min bei 40 °C im Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg, BRD) extrahiert und nachfolgend bei  $16\,300 \times g$  zentrifugiert (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Osterode, BRD; 13 000 rpm, 15 min). Der Überstand wurde in einem Reaktionsgefäß auf 2 ml mit Methanol aufgefüllt.

3 ml des abgetrennten **Mediums** wurden nach Zusatz von NaOH (pH 9,0) in einem Reagenzglas mit Schliffstopfen mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bei 40 °C am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml MeOH (grad. grade) aufgenommen. Die Medien der Dihydroalkaloid-Aufnahmeversuche wurden nicht extrahiert, sondern nach Zusatz der aus dem Glasfilter extrahierten Alkaloide (s.u.) direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt.

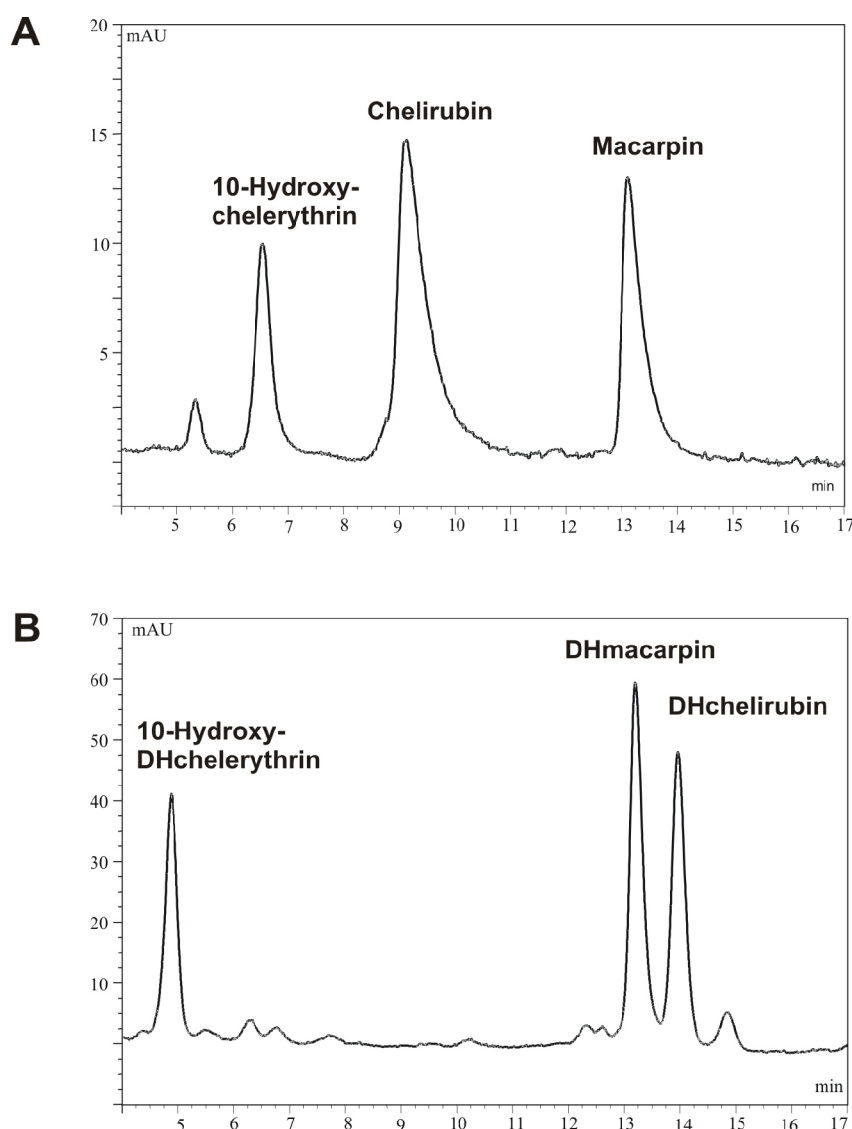
Um adsorbierte Alkaloide aus dem **Glasfilter** zu lösen, wurde dieses jeweils mit 500 µl MeOH in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß extrahiert und der Überstand nach Zentrifugation bei  $16\,300 \times g$  (3K12, 13 000 rpm, 10 min) den 3 ml Medium vor der Extraktion mit Ethylacetat zugesetzt.

Die Analyse und Quantifizierung der nach einer Methode von Villegas *et al.* [1999] erhaltenen Extrakte aus Zellen und Medium erfolgte nach 2.5.2.

### 2.5.1.3 Extraktion zur Gewinnung genuiner Benzophenanthridine

4 - 5 Tage alte Zellsuspensionen wurden für 72 - 96 Stunden mit Elicitor (1 µg/ml) inkubiert (s. 2.2, ohne Vorbehandlung). Das alkaloidhaltige Medium wurde über ein Sieb abgetrennt und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die Isolierung der Alkaloide aus wässrigem Medium basierte auf einer patentierten Extraktionsmethode (Verteilung in apolarem Lösungsmittel, Überführung der Alkaloide in Aqua demin. durch Erniedrigung des pH-Wertes, Präzipitation der Alkaloide [Boulware und Schlowisky 1990]). Das getrocknete Präzipitat wurde in Methanol aufgenommen und die Identität der Alkaloide sowie der Gehalt durch HPLC/MS-Analysen bestimmt (s. 2.5.2, Abb. 5A). Nach Herstellung einer methanolischen Lösung (1 mg/ml) wurde diese mit Wasser auf 125 µg/ml Alkaloidgehalt verdünnt. Der molaren Konzentrationsangabe wurde ein mittleres Molekulargewicht von 373 zugrunde gelegt.



**Abb. 5** HPLC-Trennung der aus elicitierten Kulturmedien isolierten Benzophenanthridine

- A) isolierte quarternäre Alkaloidmischung: 25 % 10-Hydroxychelerythrin, 40 % Chelirubin, 35 % Macarpin  
 4 - 5 Tage alte Zellsuspensionen wurden mit 1 µg/ml Hefeelicitor für 72 - 96 h inkubiert. Das alkaloidhaltige Medium wurde abfiltriert und nach einer patentierten Methode [Boulware und Schlowsky 1990] extrahiert (s. 2.5.1.3). Die Identifizierung und Quantifizierung der Extrakte erfolgte durch HPLC/MS-Analysen (s. 2.5.2, Gradient 2 für A+B). In den Chromatogrammen ist die Absorption bei 280 nm dargestellt.
- B) durch Reduktion mit Natriumborhydrid hergestellte Mischung der entsprechenden Dihydrobenzophenanthridine: 32 % 10-Hydroxydihydrochelerythrin, 38 % Dihydrochelirubin, 30 % Dihydromacarpin  
 Die methanolischen Alkaloidextrakte der elicitierten Medien (s. A) wurden durch Zusatz von Natriumborhydrid vollständig reduziert (s. 2.6, [Tanahashi und Zenk 1990b]). Bei der Gehaltsbestimmung der extrahierten Dihydrobenzophenanthridine wurden die unterschiedlichen relativen Absorptionen bei 280 nm im Vergleich zur Referenzsubstanz Sanguinarin berücksichtigt (s. 2.5.2).

### 2.5.2 Chromatographie, Identifizierung und Quantifizierung

Zur HPLC-Analyse der Alkaloidextrakte wurde eine Anlage der Firma Gynkotek (Germering, BRD) sowie Säulenmaterial der Firma Macherey-Nagel (Düren, BRD; Trennsäule: EC 250/4 Nucleosil 120-10 C18, Vorsäule: CC 8/4 Nucleosil 120-5 C18) verwendet. Die Benzophenanthridine eluierten unter Verwendung von Gradient 1 bzw. 2 und einer Flußrate von 1,5 ml/min zu den in Tab. 4 angegebenen Zeiten.

Gradient 1:		Gradient 2:	
Zeit (min)	B (%)	Zeit (min)	B (%)
0	40	0	40
2	40	7	40
7	50	10	50
17	50	15	50
25	80	17	80
30	80	25	80

Laufmittel A: Aqua demin./TFA - pH 1,9

Laufmittel B: Acetonitril (grad. grade)

Die Alkaloidpeaks wurden in Reaktionsgefäßen aufgefangen und zur massenspektrometrischen Analyse eingereicht (Massenspektrometrie: Dr. A. Schierhorn, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle). Die Elektrospray-Ionisations-Spektren wurden an einem ESQUIRE-LC Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, BRD) aufgenommen. Bei einer Flußrate von 3 µl/min wurden die Proben mit einer Spritzenpumpe (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, USA) injiziert. Das Masse/Ladungsverhältnis  $[M]^+$  der quarternären Alkaloide entspricht ihrer Molekülmasse. Die ungeladenen Dihydrobenzophenanthridine wurden während der Analyse protoniert. Aus  $[M+H]^+$  läßt sich ihre Molekülmasse berechnen. Eine Übersicht der in den untersuchten Zellsuspensionen identifizierten Benzophenanthridine ist in Tab. 4 dargestellt.

Neben der Retentionszeit und der Molekülmasse diente als weiteres Charakteristikum das Absorptionsspektrum der einzelnen Benzophenanthridine zur Identifizierung. Die während der Elution über den Diodenarray-Detektor UVD 340 (Gynkotek) aufgenommenen Absorptionsspektren wurden in einer Spektrenbibliothek (Software Chromeleon<sup>R</sup> 6.00, Dionex, Idstein, BRD) zusammengefaßt und für weitere Analysen genutzt.

**Tab. 4** Übersicht der in der verwendeten *Eschscholzia*-Kultur identifizierten Benzophenanthridine

Benzophenanthridine	M (g/mol)	m/z [M] <sup>+</sup> bzw. [M+H] <sup>+</sup>	Retentionszeit (min)	
			Gradient 1	Gradient 2
Sanguinarin *	332	332	6,2	6,5
10-Hydroxysanguinarin	348	348	4,6	5,5
Chelirubin	362	362	7,1	9,5
12-Hydroxychelirubin	378	378	5,3	6,6
Macarpin **	392	392	9,9	13,0
Chelerythrin *	348	348	8,3	8,5
10-Hydroxychelerythrin	364	364	5,8	6,5
Dihydrosanguinarin ***	333	334	13,3	14,7
10-Hydroxydihydrosanguinarin	349	350	5,8	5,7
Dihydrochelirubin ***	363	364	12,4	13,9
Dihydromacarpin ***	393	394	11,6	13,1
Dihydrochelerythrin ***	349	350	10,5	12,0
10-Hydroxydihydrochelerythrin ***	365	366	4,7	5,0

\* käuflich erworben (s. 2.17)

\*\* Als Referenzsubstanz zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. M.H. Zenk.

\*\*\* Alle als Referenz benutzten Dihydroderivate wurden durch Reduktion aus den isolierten bzw. käuflich erworbenen Benzophenanthridinen hergestellt (s. 2.6).

Grundlage für die Quantifizierung der Alkaloidextrakte bildete die Absorption der Referenzsubstanz **Sanguinarin** bei 280 nm. In einem Konzentrationsbereich von 2,5 - 20 µg/ml konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Alkaloidkonzentration und der Fläche unter der Absorptionskurve festgestellt werden. Alle weiteren Benzophenanthridine (Ausnahme Chelerythrin, s.u.) besitzen bei 280 nm im Vergleich zur Referenzsubstanz Sanguinarin identische Absorptionseigenschaften. Zur Quantifizierung der Dihydrobenzophenanthridine wurden die relativen Absorptionen dieser Alkaloide bei 280 nm ermittelt und auf die Absorption des Sanguinarins bezogen ( $A_{\text{Sang.}} = 100\%$ ). Dabei ergaben sich folgende Prozentsätze, die bei der Quantifizierung der einzelnen Alkaloide berücksichtigt wurden: Dihydrosanguinarin 77 %; 10-Hydroxydihydrosanguinarin 52 %; Dihydrochelirubin 58 %; Dihydromacarpin 88 % und 10-Hydroxydihydrochelerythrin 52 %.

Die Quantifizierung der Metabolisierungsexperimente von Chelerythrin (s. 3.2) sowie die Gehaltsbestimmung von Dihydrochelerythrin-Lösungen erfolgten mit dem Standard **Chelerythrin**. Sowohl Dihydrochelerythrin als auch 10-Hydroxydihydrochelerythrin zeigten gleiche relative Absorptionen bei 280 nm wie Chelerythrin. Zu beachten war die relative Absorption des quarternären 10-Hydroxychelerythrins mit einem Wert von 125 %.

## 2.6 Herstellung von Dihydrobenzophenanthridinen

Die Synthese von Dihydrobenzophenanthridinen erfolgte durch Reduktion von käuflich erworbenem Sanguinarin, Chelerythrin bzw. der nach 2.5.1.3 isolierten Mischung quarternärer Alkaloide mit Natriumborhydrid nach Tanahashi und Zenk [1990b]. Die mit Benzol extrahierten Dihydroalkaloide wurden nach Abdampfen des Benzols in wenig DMSO gelöst und nachfolgend mit Methanol auf 125 µg/ml Alkaloidgehalt verdünnt. Durch HPLC/MS-Analysen wurden die Identität und der Gehalt bestimmt (s. 2.5.2, Abb. 5B).

## 2.7 Bestimmung von Wachstumsparametern

### 2.7.1 Frisch- und Trockenmasse

1 ml Zellsuspension wurde über Filterpapier mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und mit Aqua demin. gewaschen. Anschließend wurde das Pellet gewogen (Frischmasse) bzw. bei 80 °C für 2 h getrocknet und nach dem Abkühlen im Exsikkator die Trockenmasse bestimmt.

### 2.7.2 Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl am CASY 1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen, BRD) wurde 1 ml Zellsuspension mit 10 µl Detergens (Mucaso<sup>®</sup>) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 9,9 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung in Casy-Meßgefäße gefüllt, mit 10 µl Mucaso<sup>®</sup> versetzt und nachfolgend mit 100 µl der vorbehandelten Zellsuspension vermischt. Mit der ausgewählten Kapillare (∅ 200 µm) wurden die Zellaggregate in einem Bereich von 13,5 - 90 µm vermessen und auf Grund der Verdünnung mit einem Faktor von 100 multipliziert. Da ein Zellfaden durchschnittlich 4 - 6 Zellen enthält, errechnete sich die mittlere Zellzahl durch Multiplikation der Zellaggregate mit dem Faktor 5.

## 2.8 Mikroskopie

Für die mikroskopische Untersuchung der Inkubation von Zellsuspensionen mit Sanguinarin wurde das Fluoreszenzmikroskop Optiphot (Nikon, Tokyo, Japan; Objektiv: Fluor 40 Nikon (NA 0,85), Filter: DM 400 Nikon UV-2A  $\lambda_{\text{Ex}} = 330 - 380$   $\lambda_{\text{Em}} > 420$ ) genutzt. Zellen aus 5 Tage alten Suspensionen wurden abgeseiht, mit phosphatfreier Nährlösung (NL-P 100 %) gewaschen und in NL-P resuspendiert (Zelldichte 25 mg FM/ml). 1 ml dieser Suspension wurde mit 100 µM Sanguinarin versetzt. Anschließend wurden Proben zur mikroskopischen Beobachtung entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe einer CCD-Kamera (Progressive 3, SONY, Tokyo, Japan) digitalisiert und mit der Software OPTIMAS<sup>®</sup> 6.2 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) gespeichert.



## 2.9 Zellfraktionierung

Ernte der Zellen:

8 Tage alte Zellsuspensionen wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua demin. wurden je etwa 40 g Frischmasse in Alufolie gepackt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Homogenisationspuffer:

50 mM	MOPS/KOH - pH 7,5
330 mM	Saccharose
5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
1 mM	PMSF (Stammlösung 100 mM in Isopropanol)
5 mM	DTE
5 mM	Ascorbinsäure
1 %	PVP (Polyclar AT)
0,2 %	RSA

Resuspensionspuffer:

15 mM	Tris/MES - pH 5,5
330 mM	Saccharose
0,1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
5 mM	KCl

Beide Lösungen wurden stets frisch hergestellt.

Gewinnung des 100 000 g-Überstandes:

Um die Aktivität von Enzymen während der Aufarbeitung auf ein Minimum zu begrenzen, wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt; Pufferlösungen sowie Rotoren wurden vorgekühlt.

40 g eingefrorener Zellen wurden mit dem 2 - 3 fachen Volumen Trockeneis in einem Mörser zerkleinert und anschließend in einer Zelmühle (Ultra-Zentrifugalmühle ZM 1000, Retsch, Haan; Ringsieb ZM, Conidurlochung 0,20 mm) bei 15 000 rpm aufgeschlossen. Nach dem Abdampfen des Trockeneises wurden die Zellen in 120 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und mit einem Glashomogenisator homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 500 × g (K23D, MLW Medizintechnik, Leipzig, DDR; 2000 rpm, 10 min) wurde der Überstand bei 6600 × g zentrifugiert (Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Instruments, Fullerton, USA; Rotor Type 70 Ti, 9500 rpm, 12 min). Durch die nachfolgende Zentrifugation bei 100 000 × g (Optima™ LE-80K, Rotor Type 70 Ti, 35 000 rpm, 1 h) wurde das mikrosomale Pellet von den löslichen Proteinen im Überstand abgetrennt. Der Proteingehalt des 100 000 g-Überstandes wurde nach Bradford bestimmt (s. 2.16).

## 2.10 Reduktion von Benzophenanthridinen durch Rohextrakt der löslichen Proteine

Chemikalien:

Pufferlösung	50 mM	MOPS/KOH - pH 7,5
	1 mM	PMSF (Stammlösung 100 mM in Isopropanol)
Alkaloide	125 µg/ml	Sanguinarinchlorid in Aqua demin.
	125 µg/ml	Chelerythrinchlorid in Aqua demin.
	125 µg/ml	Alkaloidmischung in Aqua demin. (s. 2.5.1.3)
Stopplösung	36 mM	HCl in MeOH

### 2.10.1 Reduktion durch 100 000 g-Überstand

Die Reduktion von Benzophenanthridinen durch den nach 2.9 präparierten 100 000 g-Überstand wurde nach folgendem Pipettierschema (µl) bei Raumtemperatur untersucht:

	Zeit (min) **	Homogenisationspuffer (s. 2.9)	100 000 g-Überstand	Alkaloide (125 µg/ml)
unspezifische Reduktion	0	490		10
	10	490		10
enzymatische Reduktion	0		490	10
	10		490	10
Endkonzentration				2,5 µg/ml *

\* Sanguinarin: 6,8 µM; Chelerythrin: 6,5 µM; Alkaloidmischung: 6,1 µM

\*\* Stop der Reaktion durch Zusatz von 500 µl MeOH/HCl nach 0 bzw. 10 min. Der dadurch entstandene Niederschlag wurde bei 16 300 × g abzentrifugiert (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Osterode; Rotor Nr. 12 153, 13 000 rpm, 15 min). Die Quantifizierung der Alkaloidgehalte im Überstand erfolgte nach 2.12.1.

### 2.10.2 Reduktion durch ultrafiltrierte Proteinfraction nach Zusatz von Elektronendonatoren

Der nach 2.9 präparierte 100 000 g-Überstand wurde ultrafiltriert, wobei entweder Ausschlußgrößen von 10 kDa oder 30 kDa verwendet wurden (Amicon Centricon Plus-20; 10 000 bzw. 30 000 NMWL; Millipore, Eschborn). Dabei wurden 19 ml des 100 000 g-Überstandes bei 4000 × g (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Osterode; Rotor Nr. 11 133) und 4 °C konzentriert, 3 mal mit ca. 15 ml Pufferlösung gewaschen und der Überstand anschließend mit Pufferlösung auf 19 ml aufgefüllt.

Die Reduktion der Benzophenanthridine wurde wie im 100 000 g-Überstand getestet (s. 2.10.1), wobei außerdem Elektronendonatoren in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt wurden: 5 mM GSH, DTE bzw. Ascorbinsäure (aus Stammlösungen von jeweils 250 mM) sowie 10 µM NAD(H), NADP(H) bzw. FAD (aus Stammlösungen von jeweils 1 mM).

## 2.11 FPLC-Verfahren zur Reinigung der Sanguinarin-Reduktase

(mit Unterstützung durch Dr. A. Baumert, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle)

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

### 2.11.1 Pufferlösungen für die FPLC

Die in Tab. 5 aufgeführten Puffer konnten im voraus hergestellt und einige Tage im Kühlschrank gelagert werden.

**Tab. 5** Zusammensetzung der für die FPLC-Reinigung verwendeten Pufferlösungen

<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>	<b>Puffer C</b>	<b>Puffer D</b>
10 mM Tris/HCl - pH 7,5 (Stammlösung 1 M)	<i>dto.</i>	<i>dto.</i>	<i>dto.</i>
10 % (v/v) Glycerin	<i>dto.</i>	<i>dto.</i>	<i>dto.</i>
0,5 mM Na <sub>2</sub> EDTA	<i>dto.</i>	<i>dto.</i>	<i>dto.</i>
1,7 mM β-Mercaptoethanol	<i>dto.</i>	<i>dto.</i>	<i>dto.</i>
	<b>1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>		
		<b>0,5 M NaCl</b>	
			<b>2 M NaCl</b>

### 2.11.2 Zellaufschluß und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

1000 g eingefrorener Zellen wurden mit dem 2 - 3 fachen Volumen Trockeneis in einem Mörser zerkleinert und anschließend in einer Zelmühle (Ultra-Zentrifugalmühle ZM 1000, Retsch, Haan, BRD; Ringsieb ZM, Conidurlochung 0,20 mm) bei 15 000 rpm aufgeschlossen. Nach dem Abdampfen des Trockeneises wurden die Zellen in 1700 ml Homogenisationspuffer (s. 2.9, ohne RSA) resuspendiert und für 30 min inkubiert. Alle folgenden Zentrifugationen wurden mit der Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K Ultracentrifuge (Beckman Instruments, Fullerton, USA) durchgeführt. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch zwei Zentrifugationsschritte: 1000 × g (Rotor Type 19, 3300 rpm, 10 min) sowie anschließend 15 000 × g (Rotor Type 19, 12 700 rpm, 30 min). Zum Überstand wurde unter Rühren Protaminsulfat 1 % (w/v) zugesetzt und die Suspension für 30 min gerührt. Der Niederschlag wurde bei 15 000 × g (Rotor Type 19, 12 700 rpm, 20 min) abzentrifugiert. Mit dem klaren Überstand wurde nun eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Durch Zusatz von Ammoniumsulfat (464 g/ 2055 ml) wurde eine 40%ige Sättigung erreicht. Die Suspension wurde für 1 h gerührt und nachfolgend bei 15 000 × g (Rotor Type 19, 12 700 rpm, 20 min) zentrifugiert. Die anschließende Fällung bei 80%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat (weiterer Zusatz von 580 g/ 2230 ml) wurde ebenfalls nach 1 stündigem Rühren bei 15 000

× g abzentrifugiert (Rotor Type 19, 12 700 rpm, 30 min). Das erhaltene Pellet wurde in etwa 100 ml Puffer B gelöst und bei 16 300 × g (Rotor SW 32 Ti, 11 500 rpm, 20 min) partikelfrei zentrifugiert.

### 2.11.3 FPLC-Reinigungsschritte

Zur Reinigung der Sanguinarin-Reduktase wurden 2 FPLC-Anlagen (FPLC<sup>R</sup> System\*, ÄKTA explorer\*\*) sowie Säulen der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg, BRD) verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit der Ultrazentrifuge Optima<sup>TM</sup> LE-80K (Beckman Instruments, Fullerton, USA) durchgeführt.

#### **Hydrophobe Interaktion: Phenylsepharose 6 FF\***

Die in Puffer B gelösten Proteine der 40 - 80 % Ammoniumsulfatfraktion (s. 2.11.2; 3,3 g Protein, insgesamt 100 ml) wurden in zwei Läufen auf eine mit Puffer B equilibrierte **Phenylsepharose 6 FF 26/16**-Säule (high substituted) aufgetragen (Flußrate: 2 ml/min). Die Säule wurde gespült mit Puffer B (Flußrate: 3 ml/min). Durch Elution mit einem linearen Gradienten (0 - 300 ml 0 - 100 % Puffer A, 300 - 450 ml 100 % Puffer A) wurden 10-ml-Fractionen gesammelt (Flußrate: 3 ml/min). Die zwei Aktivitätsspeaks P1 (Fraktionen 23 - 28, s. Abb. 17) und P2 (Fraktionen 34/35 - 38, s. Abb. 17) wurden getrennt weiter gereinigt. Die aktiven Fraktionen aus beiden Läufen wurden jeweils durch Fällung mit 80 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konzentriert. Nach 1 stündigem Rühren wurde der Niederschlag bei 16 300 × g abzentrifugiert (Rotor SW 32 Ti, 11 500 rpm, 30 min). Das entstandene Pellet wurde in etwa 10 ml Puffer A gelöst und nachfolgend partikelfrei bei 16 300 × g zentrifugiert (Rotor Type 70 Ti, 14 900 rpm, 10 min).

#### **Anionenaustauscher: Q Sepharose FF\***

Die konzentrierten Fraktionen von P1 (s.o.; 300 mg Protein) wurde mit Hilfe einer **HiPrep 26/10 Desalting**-Column durch Elution mit Puffer A entsalzt (Flußrate: 6 ml/min)\*\*. Die proteinhaltigen Fraktionen (UV-Absorption 280 nm) wurden auf eine mit Puffer A equilibrierte **Q Sepharose FF 16/10**-Säule aufgetragen (Flußrate: 2 ml/min). Die Säule wurde gespült mit Puffer A (Flußrate: 3 ml/min). Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten (0 - 600 ml 0 - 100 % Puffer C, 600 - 750 ml 100 % Puffer C) und 10-ml-Fractionen aufgefangen (Flußrate: 3 ml/min). Die aktiven Fraktionen 24 - 33 (s. Abb. 18) wurden mit 80 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gefällt, die Suspension für eine Stunde gerührt und dann bei 16 300 × g (Rotor SW 32 Ti, 11 500 rpm, 30 min) abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in etwa 8 ml Puffer C gelöst und partikelfrei zentrifugiert bei 16 300 × g (Rotor Type 70 Ti, 14 900 rpm, 10 min).

**Gelfiltration: Superdex 200 pg\*\***

In zwei Läufen wurden jeweils 4 ml der vorgereinigten Proteinlösung (s. Q Sepharose, 95 mg Protein) auf eine mit Puffer A equilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen (**HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade**). 5 ml-Fractionen wurden während der Elution mit Puffer A aufgefangen (Flußrate: 2 ml/min). Die aktiven Fraktionen 40 - 45 aus beiden Läufen (s. Abb. 19) wurden jeweils vereinigt.

**Anionenaustauscher: Mono Q\***

Die aktiven Fraktionen der Gelfiltration (s. Superdex, 13 mg Protein) wurden in zwei Läufen auf eine mit Puffer A equilibrierte **Mono Q HR 5/5**-Säule aufgetragen (Flußrate: 0,7 ml/min). Die Säule wurde nach dem Laden der Proteinlösung mit Puffer A gespült (Flußrate: 0,8 ml/min). Mit folgendem Gradient wurden bei einer Flußrate von 0,8 ml/min 1 ml-Fractionen gesammelt: 0 - 15 ml 0 - 20 % Puffer C, 15 - 25 ml 20 % Puffer C, 25 - 45 ml 20 - 50 % Puffer C, 45 - 65 ml 50 - 100 % Puffer C. Die Hauptaktivität wurde in den Fraktionen 6 - 8 gefunden (s. Abb. 20).

**Gelfiltration: Superose 12\***

200 µl der aktiven Fraktion 7 (s. Mono Q, 340 µg Protein) wurden auf eine mit Puffer D equilibrierte Gelfiltrationssäule (**Superose 12 HR 10/30**) aufgetragen. Durch Elution mit Puffer D (Flußrate: 0,4 ml/min) wurden 0,5 ml-Fractionen aufgefangen. Die Aktivität der Sanguinarin-Reduktase konnte in den Fraktionen 28 - 30 (entspricht 14 - 15 ml Elutionsvolumen, s. Abb. 21A) nachgewiesen werden.

Für den Aktivitätspeak P2 der Phenylsepharose 6 FF-Trennung wurden die beiden Schritte der Gelfiltration (Superdex 200 prep grade) sowie die Reinigung über eine Mono Q-Säule analog wiederholt. Sanguinarin-Reduktase-Aktivitäten konnten in vergleichbaren Fraktionen gefunden werden.

Eine detaillierte Übersicht der Reinigungsstufen für P1 zeigt Tab. 6. Während der FPLC-Reinigung wurden alle Aktivitätstests mit Sanguinarin bzw. Dihydrosanguinarin durchgeführt (s. 2.12.1 u. 2.12.2). Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgte nach der Methode von Bradford (s. 2.16).

**Tab. 6** Reinigungstabelle (detailliert)

**A:** Rohextrakt, **B:** 40 - 80 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fraktion, **C:** Phenylsepharose 6 FF (Fraktionen 23 - 28),  
**D:** Q Sepharose FF (Fraktionen 24 - 33), **E:** Superdex 200 pg (Fraktionen 40 - 45),  
**F:** Mono Q (Fraktion 7), **G:** Superose 12 (Fraktionen 28 - 30)

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>
umgesetztes Sanguinarin (µg/ml/min)	0,048	0,092	0,179	0,161	0,154	0,163	0,067
* 2,72 (µmol/l/min = mU/ml)	<b>0,131</b>	<b>0,250</b>	<b>0,487</b>	<b>0,438</b>	<b>0,419</b>	<b>0,443</b>	<b>0,182</b>
Proteingehalt (mg/ml)	2,30	33,30	2,66	1,02	0,25	1,43	0,13
Verdünnung	250	2500	250	250	250	2500	1250
Proteingehalt im Aktivitätstest (mg/ml)	<b>0,0092</b>	<b>0,0133</b>	<b>0,0106</b>	<b>0,0041</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0001</b>
spezifische Aktivität (mU/mg)	14	19	46	107	419	738	1820
Anreicherung	1	1,4	3	8	30	53	130
Gesamtprotein (mg)	4800	3330	300	95	13	3	0,2
Gesamtaktivität (mU)	67.200	63.270	13.800	10.170	5.450	2.215	364
Ausbeute (%)	100	94	21	15	8	3	0,5

## 2.12 Assays zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

Chemikalien:

Pufferlösung	10 mM	Tris/HCl - pH 7,5 (Stammlösung 1 M)
	1 mM	PMSF (Stammlösung 100 mM in Isopropanol)
Enzymlösung		FPLC-Fraktionen, verdünnt in FPLC-Puffer A (s. 2.11.1)
Elektronendonatoren	2 mM	NAD(P)H in Pufferlösung (Tris/PMSF)
	0,5 mM	NADPH in Pufferlösung (Tris/PMSF)
Substrate - Alkaloide	125 µg/ml	Sanguinarinchlorid in Aqua demin.
	125 µg/ml	Chelerythrinchlorid in Aqua demin.
	125 µg/ml	Alkaloidmischung in Aqua demin. (s. 2.5.1.3)
	125 µg/ml	Dihydrosanguinarin in MeOH (s. 2.6)
Stopplösung	36 mM	HCl in MeOH

NAD(P)H-Stammlösungen wurden stets frisch hergestellt. Alle Aktivitätsbestimmungen erfolgten bei Raumtemperatur.

### 2.12.1 Aktivitätsbestimmung der Sanguinarin-Reduktase

Pipettierschema ( $\mu\text{l}$ ):

	Zeit (min) *	Pufferlösung (Tris/PMSF)	FPLC-Puffer A	Enzym-lösung	NAD(P)H (2 mM)	Alkaloide (125 $\mu\text{g/ml}$ )
unspezif. Reduktion	0	460	20		10	10
	10	460	20		10	10
enzymat. Reduktion	0	460		20	10	10
	10	460		20	10	10
Endkonz.					40 $\mu\text{M}$ **	2,5 $\mu\text{g/ml}$ ***

\* Stop der Reaktion durch Zusatz von 500  $\mu\text{l}$  MeOH/HCl nach 0 bzw. 10 min

\*\* 10  $\mu\text{M}$  für 0,5 mM NADPH

\*\*\* Sanguinarin: 6,8  $\mu\text{M}$ ; Chelerythrin: 6,5  $\mu\text{M}$ ; Alkaloidmischung: 6,1  $\mu\text{M}$

### 2.12.2 Aktivitätsbestimmung der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase

Pipettierschema ( $\mu\text{l}$ ):

	Zeit (min) *	Pufferlösung (Tris/PMSF)	FPLC-Puffer A	Enzym-lösung	DHSanguinarin (125 $\mu\text{g/ml}$ )
unspezif. Reduktion	0	470	20		10
	10	470	20		10
enzymat. Reduktion	0	470		20	10
	10	470		20	10
Endkonz.					2,5 $\mu\text{g/ml}$ (7,5 $\mu\text{M}$ )

\* Stop der Reaktion durch Zusatz von 500  $\mu\text{l}$  MeOH/HCl nach 0 bzw. 10 min

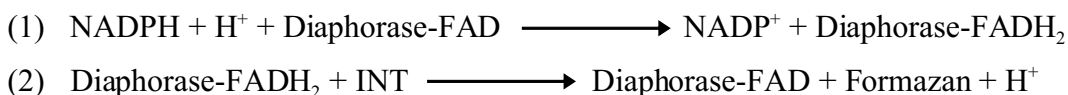
Auswertung (2.12.1 und 2.12.2):

Nach dem Stoppen der Reaktionsansätze wurden jeweils  $4 \times 100 \mu\text{l}$  in eine Mikrotiterplatte pipettiert und am Fluoreszenzreader Fluorolite™ 1000 (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei folgenden Einstellungen vermessen: Filterkombination Ex  $490 \pm 20$ , Em  $570 \pm 30$ , Lampenspannung 7 Volt für die Quantifizierung des Sanguinarins, 9 Volt zur Messung von Chelerythrin, Alkaloidmischung, Berberin, Ethidiumbromid und Propidiumjodid (vgl. 2.12.3). Zur Messung der Fluoreszenz von Dihydroalkaloiden wurden folgende Einstellungen verwendet: Filterkombination Ex  $365 \pm 25$ , Em  $450 \pm 65$ , Lampenspannung 9 Volt. Zur Messung der Reduktase-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Alkaloidkonzentrationen wurden geeignete Lampenspannungen gewählt (5 - 9 Volt für Sang., 10 u. 12 Volt für Chelerythrin). Die Berechnung der bei der Reduktion umgesetzten Alkaloide wurde anhand des Fluoreszenzabfalls durchgeführt, wobei die eingesetzte Substratkonzentration von jeweils 2,5  $\mu\text{g/ml}$  zur Kalibrierung diente und deren Fluoreszenz auf 100 % gesetzt wurde. Davon ausgehend wurden die im Lauf der Reaktion erhaltenen Fluoreszenzwerte in Alkaloidkonzentrationen umgerechnet (ein linearer Zusammenhang zwischen Benzophenanthridingehalt und Fluores-

zenz wurde in Vorversuchen nachgewiesen), wobei einerseits die Umsetzung in Gegenwart des Enzyms und zum anderen in dessen Abwesenheit (nichtenzymatischer Anteil) gemessen wurde. Die Differenz der beiden Alkaloidkonzentrationen ergibt den Umsatz durch enzymatische Reduktion. Die Quantifizierung der Dihydrobenzophenanthridine erfolgte über Eichkurven.

### 2.12.3 Bestimmung der NADPH-Umsetzung durch INT/Diaphorase-Assay

Die Umsetzung von NADPH durch die Sanguinarin-Reduktase ist meßbar durch eine nachgeschaltete Farbreaktion. NADPH reagiert in Gegenwart von Diaphorase, einem Flavoprotein, mit Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT). In einer irreversiblen Reaktion bildet sich ein intensiv gefärbtes Formazan ( $\epsilon_{492 \text{ nm}} = 19,9 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [Boehringer Mannheim 1989]). Folgende Gleichungen veranschaulichen das Meßprinzip [Michal *et al.* 1983]:



Jodnitrotetrazoliumchlorid ist empfindlich gegenüber Licht. Deshalb wurde in abgedunkelten Räumen gearbeitet.

Chemikalien:

Pufferlösung	50 mM	Tris/HCl - pH 7,0
Kontrollpuffer		FPLC-Puffer A (s. 2.11.1), 1 : 10 verdünnt in Pufferlösung
Enzymlösung		Fraktion 39 der Superdex 200-Trennung (s. Abb. 19), 1 : 10 verd. in Pufferlsg.
Coenzyme	1 mM	NADPH in Pufferlösung
	1 mM	NADP <sup>+</sup> in Pufferlösung
Substrate - Alkaloide	125 µg/ml	Sanguinarinchlorid in Aqua demin.
	125 µg/ml	Chelerythrinchlorid in Aqua demin.
	125 µg/ml	Alkaloidmischung in Aqua demin. (s. 2.5.1.3)
	125 µg/ml	Berberinchlorid in Aqua demin.
	125 µg/ml	Dihydrosanguinarin in MeOH (s. 2.6)
Substrate - Analoga	700 µM	Ethidiumbromid in Aqua demin.
	700 µM	Propidiumjodid in Aqua demin.
weitere Substrate	700 µM	Hydrocortison in MeOH
	700 µM	Pregnenolon in MeOH
	700 µM	Tropinon in MeOH
	700 µM	Dehydroascorbinsäure in Pufferlösung, frisch hergestellt
Hilfsenzym	10 U/ml	Diaphorase aus <i>Clostridium kluyveri</i> in Pufferlösung
Farbindikator	5 mM	Jodnitrotetrazoliumchlorid in Pufferlösung - mit Ultraschall suspendiert, nachfolgend 5 % Triton X-100 zugesetzt, frisch hergestellt und dunkel aufbewahrt



Pipettierschema ( $\mu\text{l}$ ):

	unspezifische Reduktion	enzymatische Reduktion	Endkonzentrationen
Pufferlösung	920	920	50 mM
Kontrollpuffer	40		
Enzymlösung		40	2,64 $\mu\text{g/ml}$
NADPH 1 mM	20	20	20 $\mu\text{M}$
Sanguinarin 125 $\mu\text{g/ml}$	20	20	2,5 $\mu\text{g/ml}$ *
15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert			
Diaphorase	20	20	0,2 U/ml
INT/Triton	20	20	0,1 mM INT/ 0,1 % Triton X-100
30 Minuten unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur inkubiert			

\* Sanguinarin: 6,8  $\mu\text{M}$ ; Chelerythrin: 6,5  $\mu\text{M}$ ; Alkaloidmischung: 6,1  $\mu\text{M}$ ; Berberin: 6,2  $\mu\text{M}$ ; Dihydrosanguinarin: 7,5  $\mu\text{M}$ ; für alle weiteren Substrate wurde das Pipettierschema angepaßt an eine Endkonzentration von 7  $\mu\text{M}$

Die Absorption des gebildeten Formazans wurde am Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia, Freiburg) bei 500 nm vermessen und nach einer vorher erstellten Eichkurve in entsprechende NADPH-Konzentrationen umgerechnet. Die Differenz aus unspezifischer und enzymatischer Reduktion stellt *die* NADPH-Konzentration dar, welche ausschließlich durch die Sanguinarin-Reduktase umgesetzt wurde.

Zum Test auf Reversibilität der Reduktase-Reaktion wurden Dihydrosanguinarin sowie Pregnenolon in Kombination mit  $\text{NADP}^+$  eingesetzt.

Neben der Umsetzung von NADPH wurde aus demselben Ansatz nach Zusatz von MeOH/HCl die Fluoreszenz der fluoreszierenden Substrate nach 2.12.1 vermessen und quantifiziert.

### 2.13 SDS-Gelelektrophorese

Hierzu wurde eine Vorschrift aus der Praktikumsanleitung Biochemische Untersuchungsmethoden [(2002), Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg] verwendet, die sich auf das SDS-PAGE-System nach Laemmli [1970] stützt.

Chemikalien:

Acrylamid-Lösung	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bisacrylamid
Gelpuffer 1 (Trenngel)	1,5 M	Tris/HCl - pH 8,8
Gelpuffer 2 (Sammelgel)	1,0 M	Tris/HCl - pH 6,8
SDS-Lösung	10 %	SDS in Aqua demin.
TEMED		Tetramethylethylendiamin
APS-Lösung	10 %	Ammoniumpersulfat in Aqua demin.; unmittelbar vor Gebrauch hergestellt
Laufpuffer (5fach konzentriert)	125 mM 1,25 M 0,5 %	Tris - pH 8,3 (eingestellt mit Glycin) Glycin SDS; vor Gebrauch 1 : 5 mit Aqua demin. verdünnt
Probenpuffer (4fach konzentriert)	0,2 M 8 % 4 % (v/v) 40 % (v/v) 0,08 %	Tris/HCl - pH 6,8 SDS $\beta$ -Mercaptoethanol Glycerin Bromphenolblau; vor Gebrauch 1 : 4 mit Probe verdünnt
Färbelösung	10 % (v/v) 50/50 % (v/v) 0,2 %	Essigsäure in Methanol/Aqua demin. Coomassie-Brillantblau G 250
Entfärbelösung 1	10 % (v/v) 50/50 % (v/v)	Essigsäure in Methanol/Aqua demin.
Entfärbelösung 2 (zur Entfärbung über Nacht)	10 % (v/v)	Essigsäure in Aqua demin.
Standardproteine: LMW-SDS Marker Kit (Amersham Biosciences, Freiburg, BRD)		

Herstellung des Polyacrylamidgels:

Die Lösungen zur Herstellung von Trenn- bzw. Sammelgel wurden nach folgendem Schema pipettiert, gut vermischt und unmittelbar im Anschluß verwendet.

	Trenngel (12 % Acrylamid, pH 8,8)	Sammelgel (5 % Acrylamid, pH 6,8)
Acrylamid-Lösung	6,0 ml	1,3 ml
Gelpuffer	(1) 3,8 ml	(2) 1,0 ml
SDS-Lösung	150 $\mu$ l	80 $\mu$ l
Aqua demin.	4,9 ml	5,5 ml
APS-Lösung	150 $\mu$ l	80 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l	8 $\mu$ l

#### Probenvorbereitung und Elektrophorese:

Die Proben wurden 1 : 4 mit Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 100 °C denaturiert (PMC Digital Dry Block Heater, Barnstead/Thermolyne, Dubuque, USA) und nachfolgend kurz zentrifugiert. Die Markerproteine wurden analog behandelt. Nach dem Auftragen von LMW-Markern und Proben (maximal 25 µl pro Geltasche) wurde die Elektrophorese gestartet: Spannung  $U = 110 \text{ V}$ , Stromstärke  $I = 30 \text{ mA}$ . Nach ca. 1,5 h war der Lauf beendet. Verwendet wurde eine Elektrophoreseapparatur der Firma Keutz (Reiskirchen, BRD).

#### Färbung und Entfärbung der Gele:

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele für 30 min auf einer Rundschüttelmaschine mit Coomassie-Brillantblau-Lösung (s.o.) gefärbt. Nachfolgend wurde der Überschuß des Farbstoffs durch Inkubation mit Entfärbelösung entfernt. Die Gele wurden mit einer Digitalkamera (CAMEDIA E-10, Olympus, Hamburg, BRD) fotografiert.

### 2.14 Bestimmung der Molekülmasse durch Gelfiltration

Auf eine Superose 12 HR 10/30-Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg, BRD) wurden jeweils 200 µl Proteinlösung (2 mg/ml) aufgetragen und die Elutionsvolumina durch UV-Absorption bei 280 nm bestimmt (s. 2.11.3). Die Säule wurde kalibriert mit Ribonuclease A (13,7 kDa), Myoglobin (17,8 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), Rinderserumalbumin (65 kDa) und Aldolase (160 kDa). Aus den Elutionsvolumina ( $v_e$ ) der Standardproteine wurden  $K_{av}$ -Werte (Verteilungskoeffizienten) nach folgender Formel berechnet:

$$K_{av} = v_e - v_0 / v_t - v_0$$

Dabei entspricht  $v_0$  dem Ausschlußvolumen der Säule (8,4 ml), das durch Auftragen von Dextranblau (2000 kDa) bestimmt wurde.  $v_t$ , das Gesamtvolumen der Säule (23,6 ml), errechnet sich aus den Abmessungen des Säulenbettes ( $d = 10 \text{ mm} / h = 300 \text{ mm}$ ). Aus den  $K_{av}$ -Werten der Standardproteine wurde eine Eichkurve erstellt, aus der nach Bestimmung des  $K_{av}$ -Wertes der Sanguinarin-Reduktase die Molekülmasse abgeschätzt werden konnte.

### 2.15 Teilsequenzierung des Sanguinarin-Reduktase-Proteins

(Kooperation mit Dr. K.-P. Rücknagel und Dr. A. Schierhorn, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle)

Das gereinigte Protein (Fraktion 29 der Superose 12-Trennung, s. Abb. 21A) wurde nach HPLC-Analyse mit DTE reduziert und anschließend mit Vinylpyridin umgesetzt. Die aus der nachfolgenden Spaltung des Proteins mit Trypsin gebildeten Polypeptide wurden durch HPLC aufgetrennt und mit einem MALDI-Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer (REFLEX II, Bruker Daltonik, Bremen, BRD) analysiert. Die Peptide  $m/z$  2451,24  $[M+H]^+$  sowie  $m/z$  2279,65  $[M+2H]^{2+}$  wurden zur N-terminalen Sequenzierung nach Edman eingesetzt.

### 2.16 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgte nach der Methode von Bradford [1976]. Zur Messung der Absorptionswerte bei 590 nm diente ein Spektrophotometer (Ultrospec II, Amersham Pharmacia, Freiburg, BRD). Eichkurven, erstellt mit dem Standardprotein Rinderserumalbumin, bildeten die Grundlage der Quantifizierung.

### 2.17 Chemikalien

Es wurden ausschließlich Chemikalien mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* verwendet.

Sanguinarinchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)
Chelerythrinchlorid	ICN Biomedicals (Eschwege, BRD)
Berberinchloridihydrat	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Methanol (gradient grade)	Carl Roth (Karlsruhe, BRD)
Acetonitril (gradient grade)	Carl Roth (Karlsruhe, BRD)
Natriumborhydrid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)
Glutathion	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)
NAD	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)
NADH Na <sub>2</sub>	Roche Diagnostics (Mannheim, BRD)
NADP Na	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)
NADPH Na <sub>4</sub>	Roche Diagnostics (Mannheim, BRD)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)
Pregnenolon (5-Pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)
Dehydroascorbinsäure	ICN Biomedicals (Eschwege, BRD)
Tropinon	ICN Biomedicals (Eschwege, BRD)
Jodnitrotetrazoliumchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)
Diaphorase aus <i>Clostridium kluyveri</i>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD)

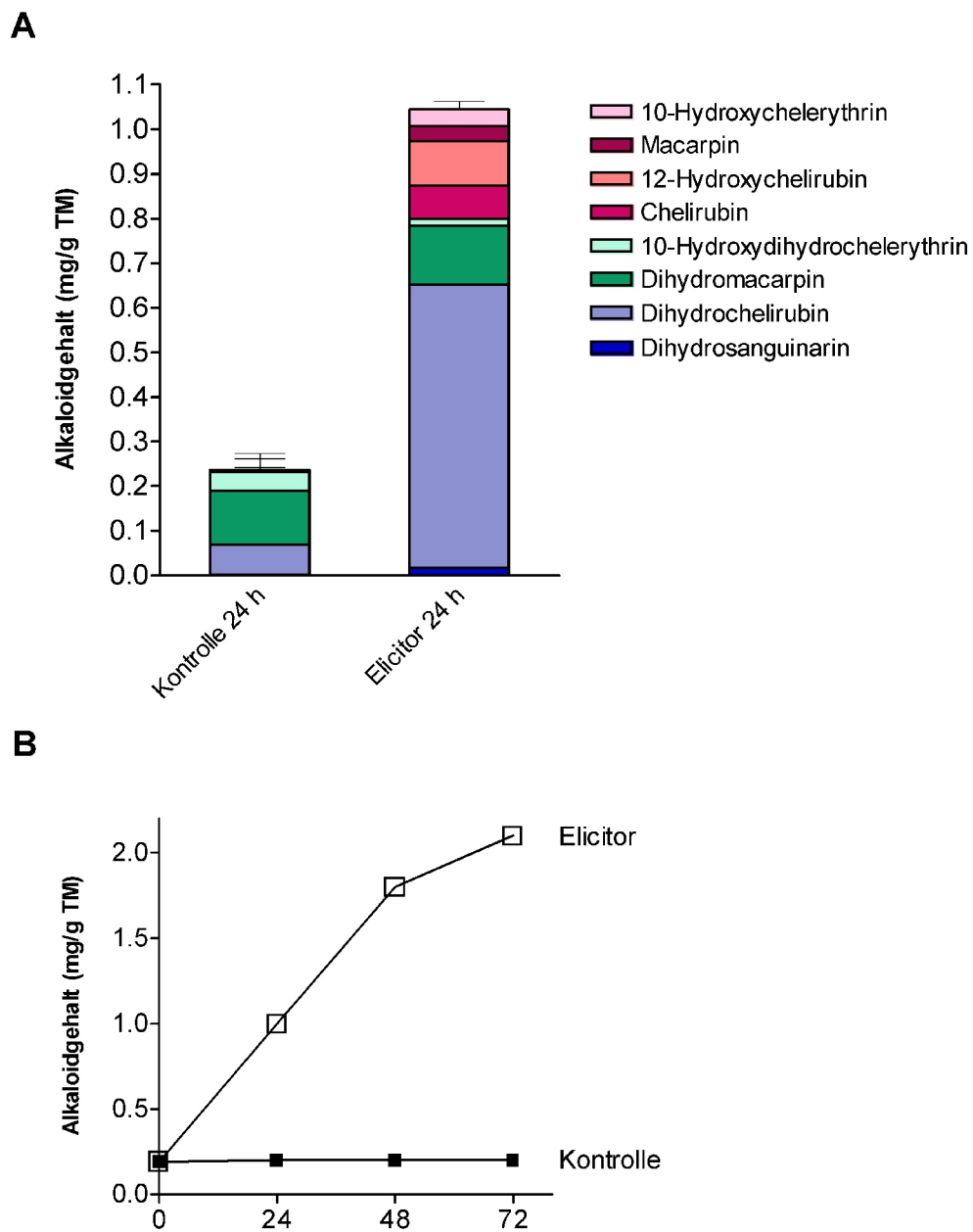
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Das Spektrum der in *Eschscholzia*-Zellsuspensionen gebildeten

##### Benzophenanthridine

Die verwendete Suspensionskultur von *E. californica* produziert in Abwesenheit externer Stressoren im wesentlichen Dihydrobenzophenanthridine (Abb. 6A, Kontrolle). Nach Kontakt mit Hefeelicitor (1 µg/ml) steigt der Gesamtalkaloidgehalt auf das 10fache (Abb. 6B). Das Alkaloidspektrum umfaßt nun auch quarternäre Benzophenanthridine (ca. 24 %, Abb. 6A, Elicitor). Die Hauptalkaloide nach 24 h Elicitorkontakt sind Dihydrochelirubin (60 %), Dihydromacarpin (13 %), 12-Hydroxychelirubin (10 %) sowie Chelirubin (7 %). Abb. 7 zeigt das Auftreten der einzelnen Alkaloide nach Elicitorbehandlung. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h sind ausschließlich niedrige Konzentrationen an Dihydrochelirubin, Dihydromacarpin, 10-Hydroxydihydrochelerythrin sowie Dihydrosanguinarin nachweisbar. Nach 6-stündigem Elicitorkontakt werden neben der verstärkten Synthese von Dihydrobenzophenanthridinen auch Chelirubin, 12-Hydroxychelirubin sowie Macarpin gebildet. 10-Hydroxychelerythrin erscheint 8 h nach Zusatz des Elicitors.

Die Dihydrobenzophenanthridine werden ausschließlich in den Zellen gespeichert, während die quarternären Alkaloide Chelirubin, Macarpin und 10-Hydroxychelerythrin fast vollständig ins Medium ausgeschieden werden (Abb. 8). Beträgt der Anteil der ins Medium abgegebenen Alkaloide 24 h nach Elicitorzusatz etwa 13 %, so steigt dieser nach 72 h auf 21 % der Gesamtalkaloide. Die im Zellpellet gemessenen quarternären Benzophenanthridine stellen vermutlich den Anteil der ausgeschiedenen Alkaloide dar, welcher an Zellwände gebunden ist. Dafür sprechen Untersuchungen mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie, in denen die charakteristische Fluoreszenz der Benzophenanthridine (ca. 540 - 610 nm, s. Tab. 3) nicht innerhalb intakter Zellen, sondern im Zellwandbereich nachgewiesen wurde [Färber *et al.* 2003, Viehweger 2003]. Daneben werden auch die an die DNA toter Zellen gebundenen Alkaloide im Zellpellet gefunden.

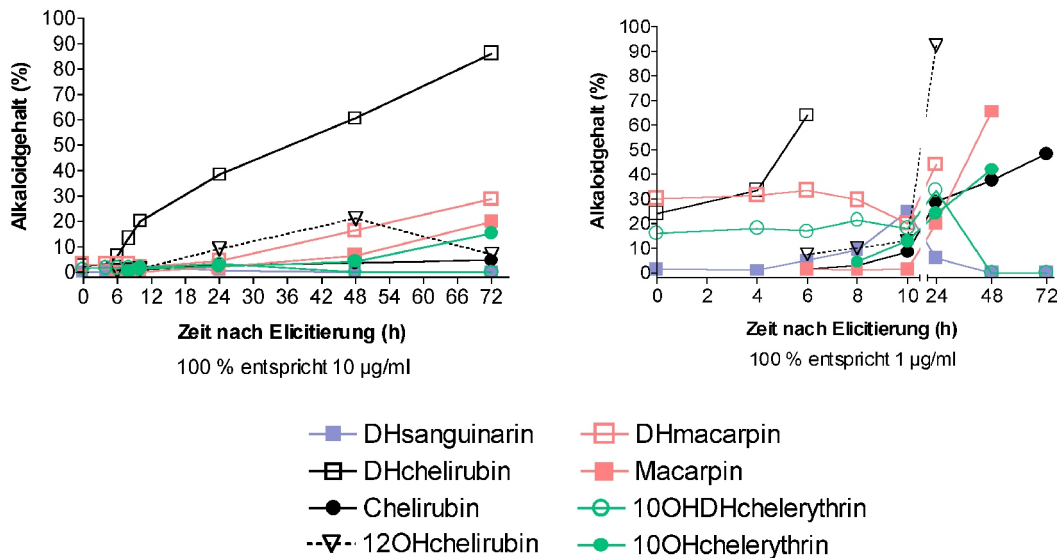


**Abb. 6** Alkaloidbildung in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*

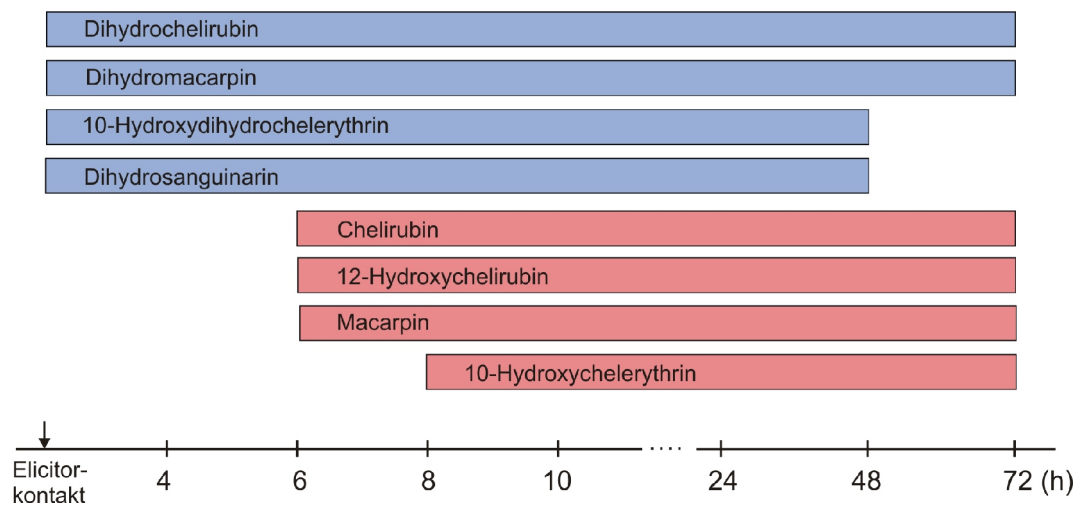
- A) Alkaloidmuster von Kontroll- und elicitierten Zellkulturen nach 24-stündiger Inkubation
- B) Alkaloidgehalte nach Elicitierung (1  $\mu\text{g/ml}$  Hefeelicitor) im Vergleich zu Kontroll suspensionen

5 Tage alte Zellsuspensionen wurden unter sterilen Bedingungen mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Hefeelicitor inkubiert (s. 2.2). Nach den angegebenen Zeiten erfolgte die Extraktion (EtAc, MeOH [Villegas *et al.* 1999], s. 2.5.1.1) und Quantifizierung der Alkaloide in Kontroll- und elicitierten Zellsuspensionen durch HPLC-Analyse (s. 2.5.2). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus 8 voneinander unabhängigen Versuchen (A) bzw. Mittelwerte für  $n = 2$  (B).

A

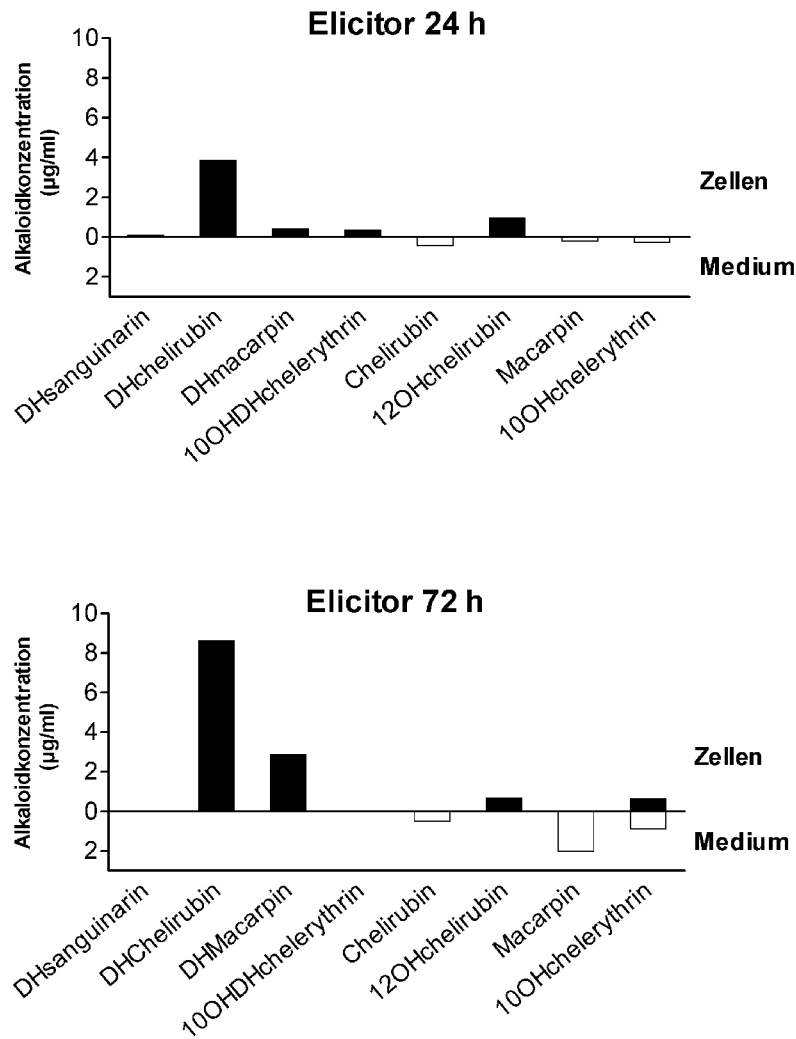


B



**Abb. 7** Dynamik der Alkaloidbildung nach Elicitierung

Jeweils 100 ml 5 Tage alter Zellsuspensionen wurden mit 1 µg/ml Hefeelicitor inkubiert (s. 2.2), nach den angegebenen Zeiten wurden Zellen und Kulturmedium getrennt und extrahiert (EtAc, MeOH [Villegas *et al.* 1999], s. 2.5.1.1). Die Alkaloidextrakte wurden durch HPLC aufgetrennt und quantifiziert (s. 2.5.2). Die Daten sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. In Abbildung 7B sind die Daten aus (A) als Balkendiagramm dargestellt.



**Abb. 8** Verteilung der Alkaloide zwischen Zellen und Außenmedium nach 24- bzw. 72-stündiger Elicitorbehandlung  
Die Daten sind aus Abb. 7 entnommen.



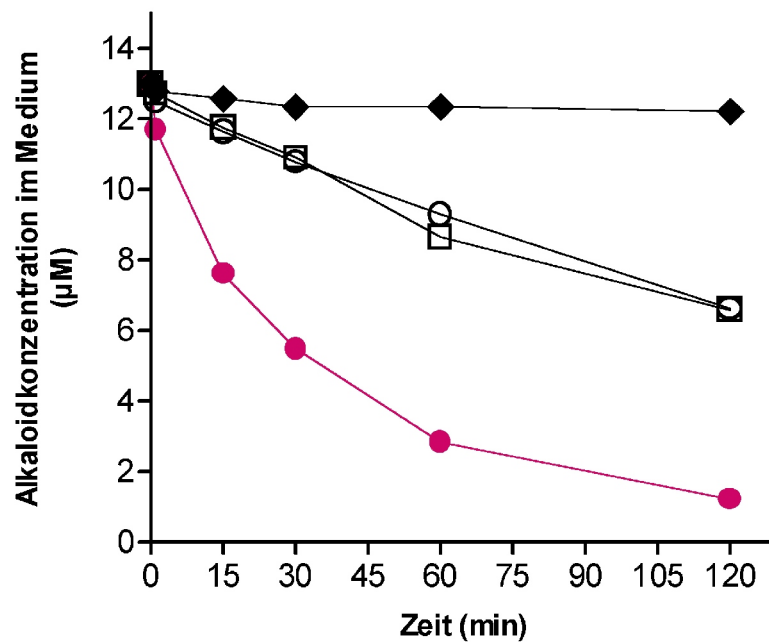
### 3.2 Aufnahme, Reduktion und Metabolismus zugesetzter Benzophenanthridine durch Zellsuspensionen

Obwohl auf Grund des Biosyntheseverlaufs die Bildung von Sanguinarin als erstes Benzophenanthridin zu erwarten ist (vgl. Abb. 2 und 3), war dieses Alkaloid weder in Kontrollkulturen noch nach Behandlung mit niedrigen Elicitorkonzentrationen detektierbar. Die im Biosyntheseverlauf folgenden, höher substituierten Benzophenanthridine wurden dagegen in elicitierten Kulturen stets gefunden (s. 3.1). Aus der Arbeitsgruppe Zenk ist jedoch bekannt, daß hohe Elicitorkonzentrationen ( $> 10 \mu\text{g/ml}$ ) in *Eschscholzia*-Zellkulturen einen deutlichen Anstieg an Sanguinarin bewirken [Schumacher *et al.* 1987, Gundlach 1992]. Ebenso fanden Collinge und Brodelius [1989] nach Elicitierung mit Hefeelicitor (50  $\mu\text{g}$  Kohlenhydrat/g FM) einen transienten Anstieg an Sanguinarin sowie Chelerythrin. Nach unseren Erfahrungen führen diese Elicitorkonzentrationen zum Absterben eines deutlich erkennbaren Anteils der Zellen. Daraus ergab sich der Verdacht, daß die Akkumulation von Sanguinarin mit dem Absterben von Zellen verknüpft ist. Eine naheliegende Vermutung wäre, daß das Sanguinarin in intakten Zellen einem Metabolisierungsvorgang unterliegt, der in zerstörten Zellen nicht mehr abläuft.

Tatsächlich wurde nach externem Zusatz von Sanguinarin ein Abfall der Konzentration im Medium gefunden, welcher bei Inkubation mit anderen Benzophenanthridinen nicht oder sehr viel langsamer erfolgte (Abb. 9). Berberin, ein von *E. californica* nicht synthetisiertes, strukturverwandtes Isochinolin-Alkaloid (s. Abb. 31), verbleibt dagegen unverändert im Außenmedium.

Der Abfall des Sanguinarins im Medium ist unmittelbar mit der Aufnahme in die Zellen und seiner dortigen Umwandlung verbunden: Bereits nach kurzer Zeit ist das extern zugesetzte Alkaloid nicht mehr in der Zellsuspension nachweisbar (Abb. 10A); zugleich entsteht Dihydrosanguinarin, welches nur in den Zellen, nicht aber im Medium nachweisbar ist (s. u.). Der Aufnahme- und Metabolisierungsprozeß zeigt eine überraschend hohe Kapazität: Aus einer 500  $\mu\text{M}$  Sanguinarinlösung wird das Alkaloid innerhalb von 5 h zu 83 % abgebaut. Die halbmaximale Geschwindigkeit der Umwandlung wird bei etwa 146  $\mu\text{M}$  Sanguinarin erreicht (Abb. 10B).

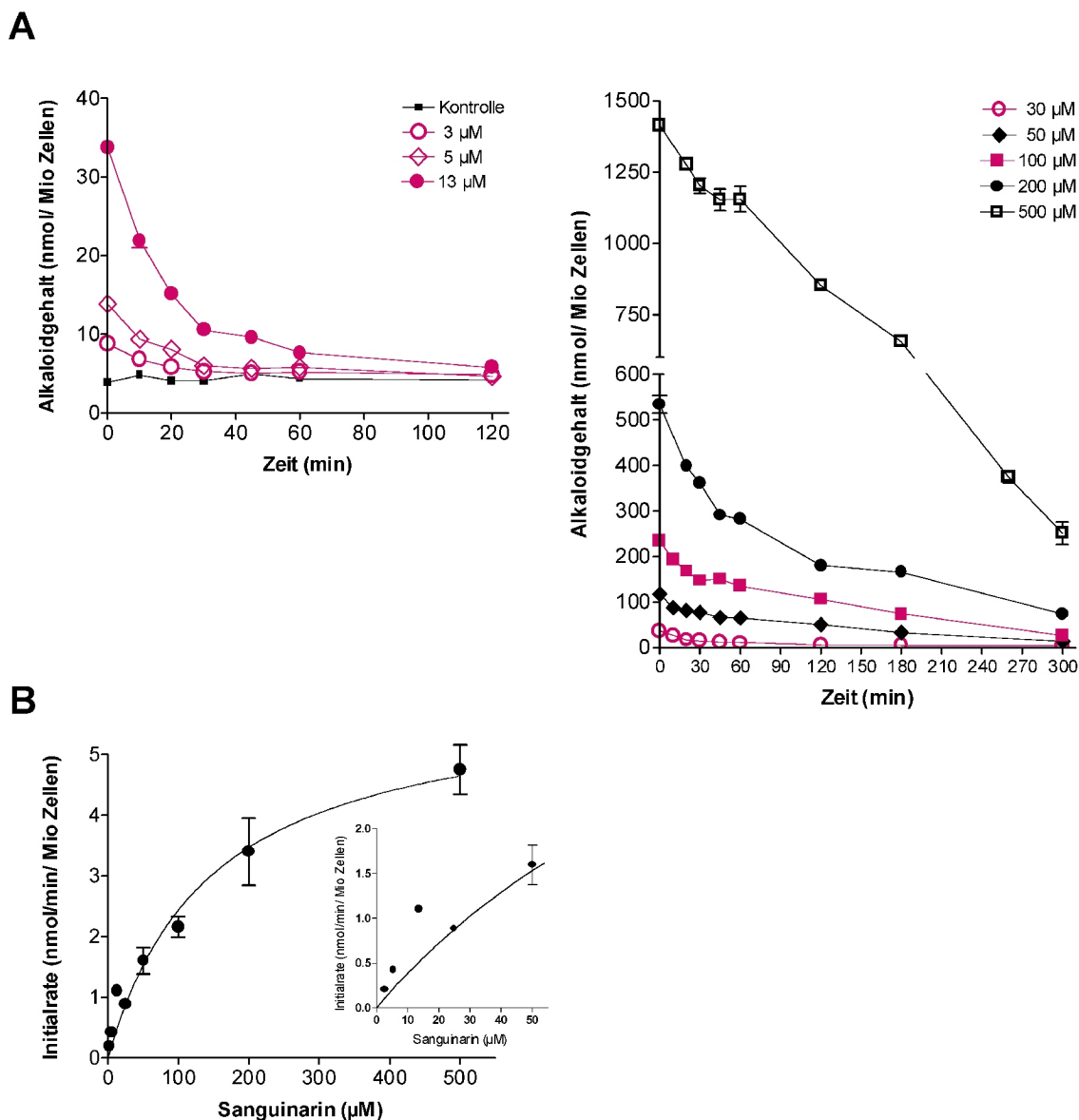
Auf zellulärer Ebene bestätigt die Änderung der typischen Fluoreszenz der Alkaloide die rasche Metabolisierung von Sanguinarin: Ca. 10 min nach Zusatz von Sanguinarin erfolgt ein starker Anstieg an blauer Fluoreszenz (420 - 500 nm) in den Zellen, welche aus dem Cytosol in die Vakuole übergeht (Abb. 11). Parallel ist ein Abfall der roten Fluoreszenz des Sanguinarins im Außenmedium detektierbar; eine Aufnahme von Sanguinarin in die Zellen, d. h. das Auftauchen von roter Fluoreszenz, war nicht zu beobachten.



**Abb. 9** Abfall der Außenkonzentration von Benzophenanthridinen bei Inkubation mit Zellsuspensionen von *E. californica*

Jeweils 12 ml einer 6 Tage alten Zellsuspension (80 mg FM/ml) wurden mit je 13 µM Alkaloid inkubiert (s. 2.3). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 2 ml Proben entnommen und nach Zentrifugation die Fluoreszenz im Überstand vermessen und quantifiziert (s. 2.4.1).

- Sanguinarin
- Chelerythrin
- isolierte Alkaloidmischung (10-Hydroxychelerythrin, Chelirubin, Macarpin; s. 2.5.1.3)
- ◆ Berberin

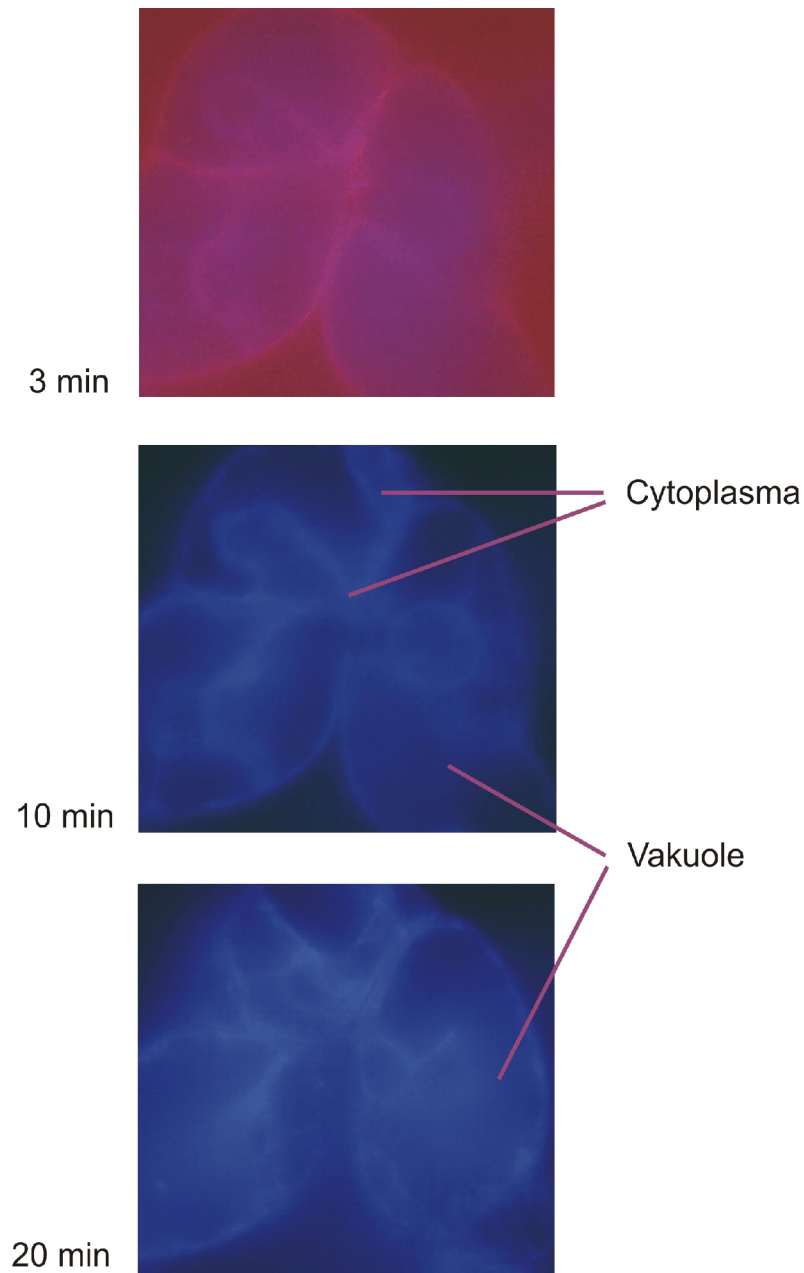


**Abb. 10** Umwandlung von extern zugesetztem Sanguinarin durch Zellsuspensionen

- A) zeitlicher Verlauf  
 B) Bestimmung des apparenten  $K_M$ -Wertes

Jeweils 20 ml einer Zellsuspension (ca. 80 mg FM/ml) wurden mit den angegebenen Sanguinarinkonzentrationen inkubiert (s. 2.3). Zur Bestimmung der Alkaloidgehalte (Extraktion mit MeOH/HCl, s. 2.4.2) wurden je Zeitintervall 500  $\mu$ l, zur Messung der Zellzahl (s. 2.7.2) jeweils 1 ml Probe entnommen.

Aus der in den ersten 10 min umgesetzten Sanguinarinmenge wurden Initialraten bestimmt. Durch Auswertung nach der Michaelis-Menten-Kinetik wurde ein  $K_M$ -Wert von 146  $\mu$ M Sanguinarin ermittelt ( $V_{max} = 6$  nmol/min/Mio Zellen;  $R^2 = 0,97$ ). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD einer Dreifachbestimmung ( $n = 1$ ).



**Abb. 11** Fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Inkubation von Zellsuspensionen mit Sanguinarin

Die Aufnahme von quarternärem Sanguinarin (rote Fluoreszenz im Außenmedium sowie in Zellwandbereichen) durch intakte Zellen von *E. californica* ist möglich durch Reduktion unter Bildung von Dihydrosanguinarin. Dieses erscheint als blaue Fluoreszenz im Cytoplasma der Zellen, nachfolgend auch in der Vakuole, jedoch nicht im Außenmedium.

Zellen einer 5 Tage alten Suspension wurden nach Zusatz von 100  $\mu\text{M}$  Sanguinarin mit dem Fluoreszenzmikroskop Nikon Optiphot untersucht ( $\lambda_{\text{Ex}} = 330 - 380$ ,  $\lambda_{\text{Em}} > 420$ ; s. 2.8).

HPLC-Untersuchungen bestätigten die intrazelluläre Akkumulation von Dihydrobenzophenanthridinen nach Inkubation mit Sanguinarin (Abb. 12A). Der enge Zusammenhang zwischen dem Verschwinden von Sanguinarin im Außenmedium und dem intrazellulären Anstieg des Dihydrosanguinarins weist darauf hin, daß die Aufnahme des Sanguinarins in die Zellen eng mit der Reduktion des Alkaloids gekoppelt ist. Später wird gezeigt, daß die Reduktion des Sanguinarins durch enzymatische Katalyse im Cytoplasma erfolgt (s. 4.1).

Aus der HPLC-Analyse (Abb. 12A) lassen sich folgende Charakteristika des Umwandlungsvorgangs von Sanguinarin ableiten: Das Reduktionsprodukt Dihydrosanguinarin wird höchstwahrscheinlich durch Hydroxylierung und Methoxylierung weiter umgewandelt zu 10-Hydroxydihydrosanguinarin und Dihydrochelirubin (Abb. 15). Offenbar erreicht das neugebildete Dihydrosanguinarin die intrazellulären Biosyntheseorte und wird - als erstes Alkaloid mit Benzophenanthridinstruktur - in einige der nach dem Biosyntheseweg zu erwartenden Folgeprodukte umgewandelt. Dies schließt wahrscheinlich auch die erneute Oxidation zu Benzophenanthridinen ein: Nach Fütterung von 500  $\mu\text{M}$  Sanguinarin wurde neben den genannten Derivaten des Dihydrosanguinarins auch die Bildung von 10-Hydroxysanguinarin beobachtet. Das Ausmaß der Metabolisierung verschiedener Konzentrationen an Sanguinarin ist in Tab. 7 zusammengefaßt. Auch wenn ein endgültiger Beweis mit Hilfe von Tracermarkiertem Alkaloid bisher nicht unternommen wurde, spricht der deutliche Anstieg der oben genannten Alkaloide dafür, daß das aufgenommene Sanguinarin nach seiner Reduktion weiter metabolisiert wird.

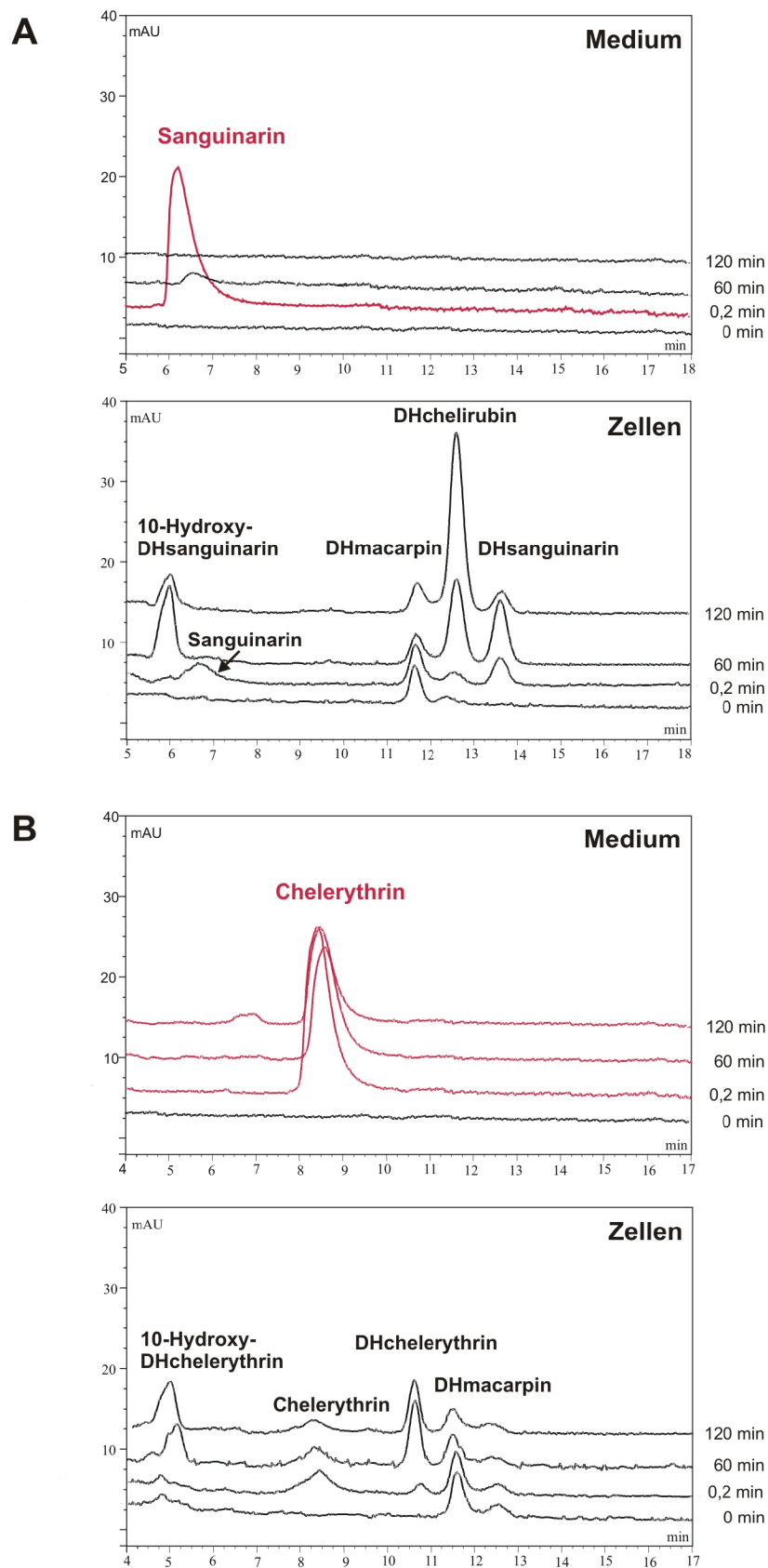
**Tab. 7** Übersicht zur Metabolisierung verschiedener Konzentrationen an Sanguinarin durch Zellsuspensionen von *E. californica*

Zellsuspensionen (ca. 80 mg FM/ml) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Sanguinarin inkubiert (s. 2.3). Nach den angegebenen Zeiten wurden Zellen und Kulturmedien getrennt und extrahiert (EtAc, MeOH [Villegas *et al.* 1999], s. 2.5.1.2) und durch HPLC-Analyse quantifiziert (s. 2.5.2).

Sang. ( $\mu\text{M}$ )	Zeit (min)	aufgenommenes Sanguinarin	neu gebildete Alkaloide			
			DH- sanguinarin	10OH- DHsang.	DH- chelirubin	10OH- sanguinarin
13	60	89 %	35 %	22 %	43 %	--
100	60	80 %	84 %	9 %	7 %	--
13	120	100 %	14 %	20 %	66 %	--
100	120	100 %	73 %	18 %	9 %	--
500	300	89 %	74 %	18 %	4 %	4 %

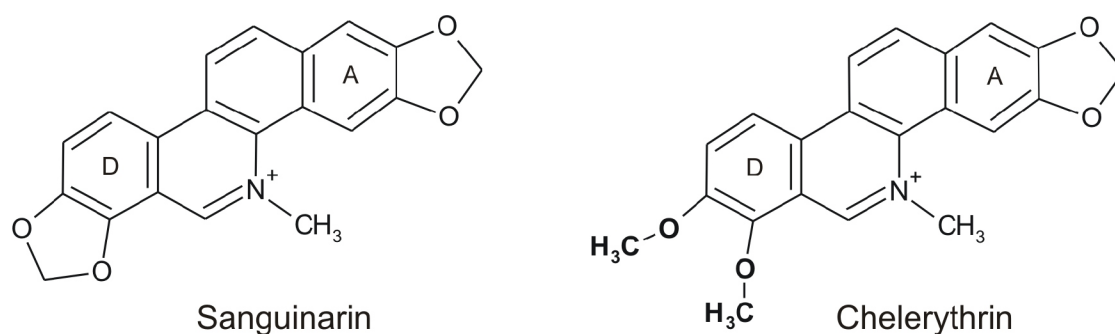
**Abb. 12** HPLC-Trennung der nach Inkubation von Zellsuspensionen mit Sanguinarin (A) bzw. Chelerythrin (B) extrahierten Alkaloide

Zellsuspensionen wurden mit 13  $\mu\text{M}$  Alkaloid inkubiert (s. 2.3), nach den angegebenen Zeiten wurden Zellen und Kulturmedium getrennt und extrahiert (EtAc, MeOH [Villegas *et al.* 1999], s. 2.5.1.2). Über eine RP-18-Säule wurden die Alkaloidextrakte aufgetrennt und quantifiziert (s. 2.5.2, Gradient 1). In den Chromatogrammen ist die Absorption bei 280 nm dargestellt.



**Abb. 12** HPLC-Trennung der nach Inkubation von Zellsuspensionen mit Sanguinarin (A) bzw. Chelerythrin (B) extrahierten Alkaloide

Die hohe Selektivität der Reduktion von Sanguinarin wird durch einen Vergleich mit strukturähnlichen Benzophenanthridinen bestätigt: Nach 2-stündiger Inkubation mit 13  $\mu\text{M}$  Chelerythrin, welches sich von Sanguinarin durch eine veränderte Substitution an Ring D unterscheidet (Abb. 13), betrug der im Kulturmedium verbliebene Anteil noch etwa 54 %, während Sanguinarin im gleichen Zeitraum vollständig aufgenommen und reduziert wurde (Abb. 12). In Analogie zu Sanguinarin ist jedoch ebenfalls ein Anstieg an Dihydrochelerythrin sowie 10-Hydroxydihydrochelerythrin nachweisbar.



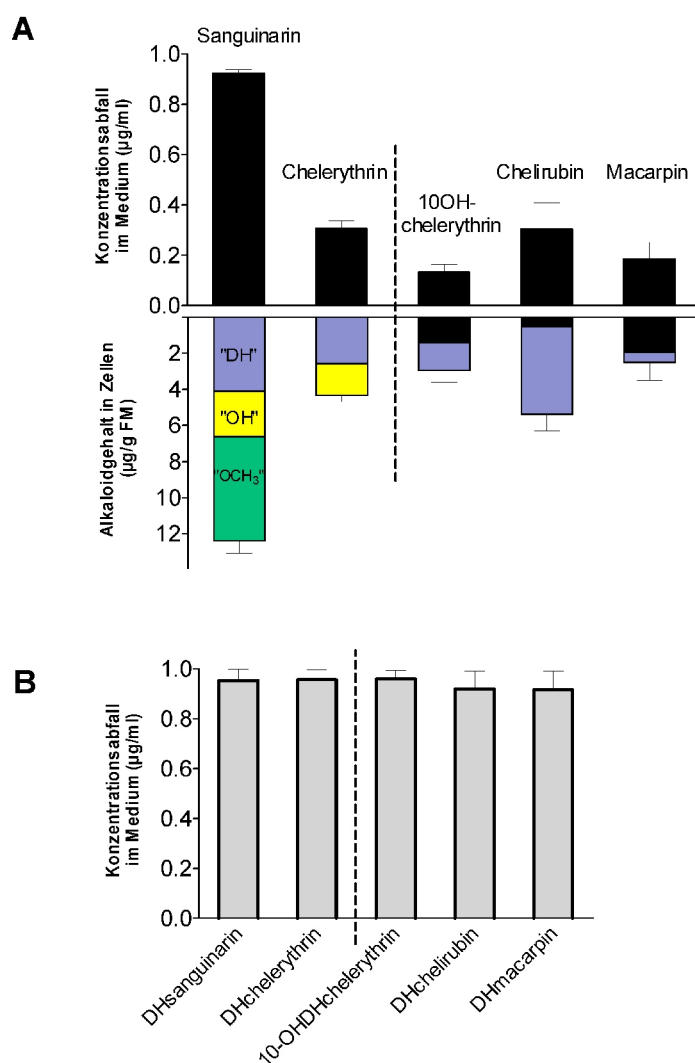
**Abb. 13** Chemische Strukturen der Benzophenanthridine Sanguinarin und Chelerythrin

Abb. 14A zeigt, daß Chelirubin, welches als Dihydrochelirubin in den Zellen erscheint, in vergleichbarem Umfang wie Chelerythrin aufgenommen wird. Dagegen wurde für 10-Hydroxychelerythrin und Macarpin eine sehr geringe Aufnahme- und Reduktionsrate festgestellt.

Im Gegensatz zur hohen Selektivität bei der Aufnahme von Benzophenanthridinen werden die entsprechenden Dihydroalkaloide unabhängig von ihrer Struktur mit etwa gleicher, sehr hoher Geschwindigkeit aufgenommen. Die Inkubation von Zellsuspensionen mit partialsynthetisch hergestellten Dihydroalkaloiden zeigte, daß bereits nach wenigen Sekunden alle angebotenen Dihydrobenzophenanthridine aus dem Medium verschwunden sind (Abb. 14B).

Nachfolgende HPLC-Untersuchungen lassen vermuten, daß aufgenommenes Dihydro-sanguinarin über 10-Hydroxydihydrosanguinarin zu Dihydrochelirubin umgewandelt wird. Demzufolge wird der gleiche Metabolisierungsweg wie für das bei der Aufnahme von Sanguinarin gebildete Dihydrosanguinarin gewählt (Abb. 15).





**Abb. 14** Aufnahme und Umwandlung verschiedener Benzophenanthridine durch Zellsuspensionen von *E. californica*

- A) Strukturspezifische Aufnahme quarternärer Benzophenanthridine durch selektive Reduktion  
 B) Unspezifische Aufnahme von Dihydrobenzophenanthridinen

Zellsuspensionen (70 mg FM/ml) wurden mit

A) Sanguinarin, Chelerythrin (je 5  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. isolierter Alkaloidmischung (s. 2.5.1.3; 30  $\mu\text{g/ml}$ ) für 60 min inkubiert (s. 2.3).

B) Dihydrosanguinarin, Dihydrochelerythrin (je 10  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. reduzierter Alkaloidmischung (s. 2.6; 15  $\mu\text{g/ml}$ ) für 1 min inkubiert (s. 2.3).

Die aus den Zellen und Medien extrahierten Alkaloide (EtAc, MeOH [Villegas *et al.* 1999], s. 2.5.1.2) wurden durch HPLC-Analyse quantifiziert (s. 2.5.2). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen. Die Daten sind normiert auf eine Ausgangskonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  Alkaloid.

Die in den Zellen erscheinenden Dihydroalkaloide (A) sind blau, die hydroxylierten Derivate gelb gekennzeichnet. Dihydrochelirubin, ein methoxylierter Metabolit des Dihydrosanguinarins, ist grün dargestellt. Die im Zellpellet detektierten Benzophenanthridine sind vermutlich an Zellwände gebunden (vgl. Färber *et al.* [2003], Viehweger [2003]).

Aufgenommenes Dihydrochelirubin sowie Dihydromacarpin bleiben unverändert erhalten; dies wurde aus dem Fehlen entsprechender HPLC-Peaks in Analysen analog zu Abb. 14A abgeleitet. Beide Alkaloide bilden gemeinsam mit 10-Hydroxydihydrochelerythrin den Hauptanteil der in nichtstimulierten Suspensionen identifizierten Benzophenanthridine (s. Abb. 6A). Aufgenommenes Dihydrochelerythrin sowie 10-Hydroxydihydrochelerythrin werden teilweise zum quarternären 10-Hydroxychelerythrin oxidiert, welches ins Medium ausgeschieden wird. Die sich aus den genannten Ergebnissen abgeleitete Vorstellung über das Zusammenspiel von Aufnahme und Metabolisierung ist in Abb. 15 dargestellt.

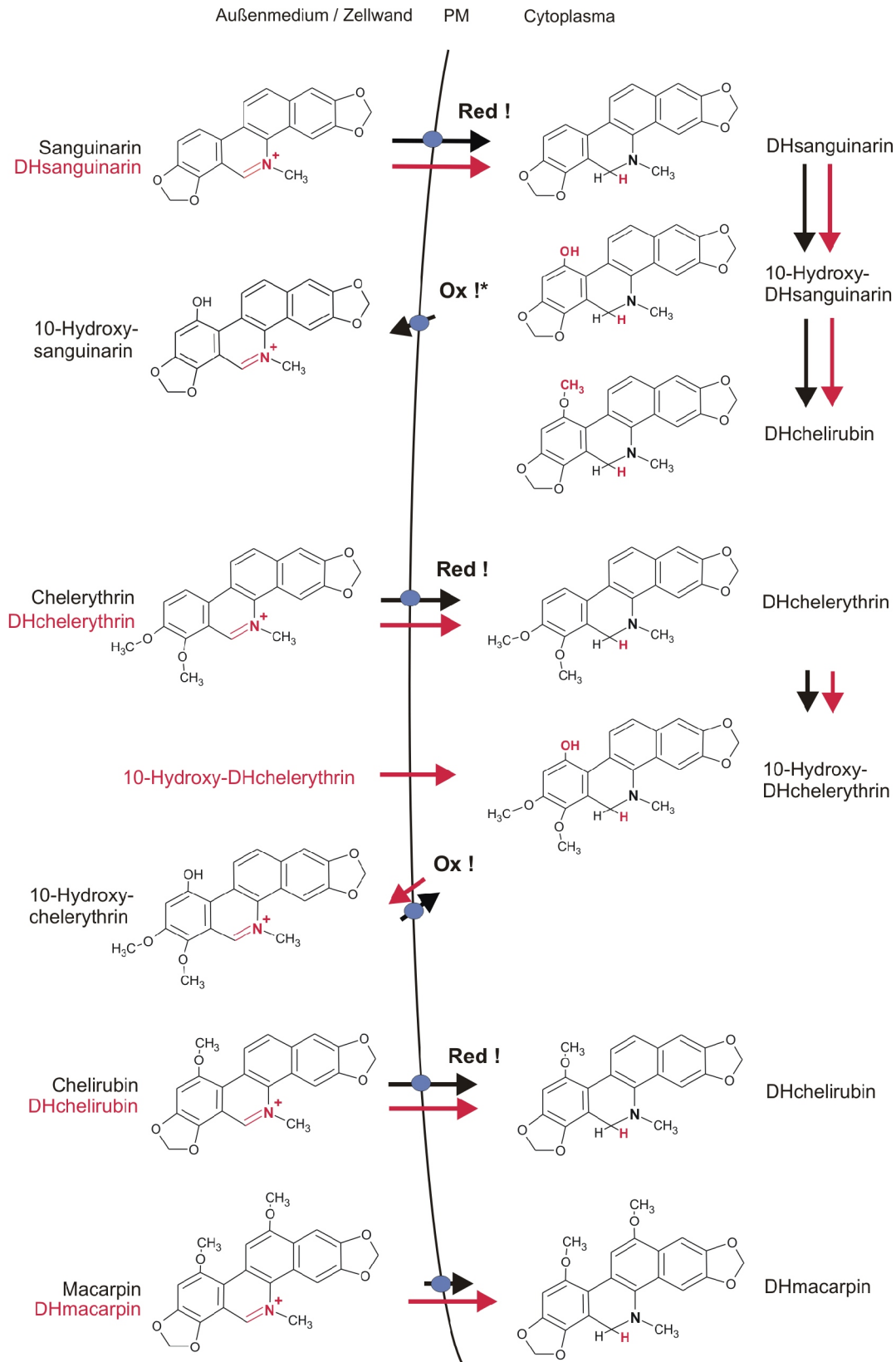
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Benzophenanthridine durch Zellsuspensionen von *E. californica* aufgenommen und umgewandelt werden können. Deutlich bevorzugt wird Sanguinarin, das am einfachsten strukturierte Benzophenanthridin. Die Aufnahme der Alkaloide ist mit ihrer vollständigen Reduktion zu Dihydrobenzophenanthridinen gekoppelt. Die intrazellulär gebildeten Dihydroalkaloide werden analog dem Biosyntheseverlauf weiter metabolisiert. Die Reduktion der Benzophenanthridine ist der limitierende Schritt für die Aufnahme der quarternären Alkaloide.

Die Toxizität des Sanguinarins kann durch dessen Reduktion entscheidend verringert werden. Dies geht aus Experimenten mit Zellkulturen anderer Spezies hervor, welche Sanguinarin nicht reduzieren können. Während in der hier verwendeten Kultur von *E. californica* der Zusatz von 13 µM Sanguinarin keine Beeinträchtigung des Wachstums auslöst, führt derselbe Zusatz bei einer Kultur von *Nicotiana tabacum* zu einem sofortigen Wachstumsstillstand. In dieser Kultur kann Sanguinarin nicht bzw. nur in einem wesentlich geringeren Maße abgebaut werden als in *Eschscholzia*-Suspensionen [L. Krückemeier, unveröffentlicht]. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Reduktion von Sanguinarin keine allgemeine Eigenschaft aller Pflanzenzellen darstellt, sondern spezifisch für die verwendete Zellkultur ist.

**Abb. 15** Modell zur Aufnahme und Metabolisierung verschiedener Benzophenanthridine durch Zellsuspensionen von *E. californica*

Externe Benzophenanthridine, insbesondere Sanguinarin, werden unter Reduktion in die Zellen aufgenommen. Intrazelluläres Dihydrosanguinarin wird, dem Biosyntheseverlauf folgend, bis zu Dihydrochelirubin metabolisiert. Zugesezte Dihydrobenzophenanthridine reichern sich rasch im Cytoplasma an. Während aufgenommenes Dihydrosanguinarin ebenfalls hydroxy- und methoxyliert wird, werden die Dihydroderivate höher substituierter Alkaloide nicht weiter metabolisiert.

Zellsuspensionen wurden, wie in Abb. 14 und Tab. 7 beschrieben, mit quarternären bzw. reduzierten Benzophenanthridinen inkubiert. Durch Extraktion und nachfolgende HPLC-Analyse wurde das Alkaloidmuster innerhalb von 2 h (bzw. 5 h für 500  $\mu$ M Sanguinarin) untersucht. Die Bildung von 10-Hydroxysanguinarin (\*) war nur nach Inkubation mit 500  $\mu$ M Sanguinarin nachweisbar (vgl. Tab. 7).



**Abb. 15** Modell zur Aufnahme und Metabolisierung verschiedener Benzophenanthridine durch Zellsuspensionen von *E. californica*

### 3.3 Reduktion von Sanguinarin durch ein lösliches Enzym

Wie in Kapitel 3.2. beschrieben, läßt sich nach Zusatz von Sanguinarin das Reduktionsprodukt Dihydrosanguinarin ausschließlich in den Zellen und nicht im umgebenden Medium nachweisen. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Benzophenanthridin-reduzierende Aktivität intrazellulär lokalisiert ist. Zellfraktionierungsexperimente bestätigen, daß Sanguinarin nur durch den 100 000 g-Überstand, nicht jedoch durch die gesamte Membranfraktion (Mikrosomales Pellet) reduziert wird (s. Abb. 27B). Dieses Ergebnis spricht für eine lösliche, nicht an Membranen gebundene Enzymaktivität. Daß es sich bei der gemessenen Umsetzung tatsächlich um einen enzymatisch katalysierten Prozeß handelt, wurde durch die vollständige Deaktivierung nach Erhitzen auf 100 °C oder nach Einwirkung von 0,2 % SDS gezeigt.

Der 100 000 g-Überstand war in der Lage, Sanguinarin ohne Zusatz von Cosubstraten zu reduzieren, was auf die Anwesenheit endogener Elektronendonatoren hinweist. Dafür spricht auch, daß nach der weiteren Fraktionierung dieses Überstandes durch Ultrafiltration weder in der < 10 kDa- noch in der > 10 kDa-Fraktion eine Umsetzung von zugesetztem Sanguinarin stattfand. Später wird gezeigt, daß für die Reduktion des Alkaloids in der > 10 kDa-Fraktion die niedermolekularen Elektronendonatoren fehlen, während das Ultrafiltrat < 10 kDa kein Enzymprotein enthält (s. Abb. 35).

Nach fraktionierter Fällung mit Ammoniumsulfat wurde die Sanguinarin-reduzierende Aktivität nahezu vollständig in den bei 40 - 80 % gefällten Proteinen gefunden, wenn diese mit NADH oder NADPH inkubiert wurden. Mit dem Elektronendonator NADH wurde ein Assay aufgebaut, der zur Verfolgung der Sanguinarin-Reduktase-Aktivität während der Reinigung durch FPLC diene.

### 3.4 Reinigung der Sanguinarin-Reduktase mittels FPLC

#### 3.4.1 Vorversuche und Reinigungsstrategie

Ausgangspunkt für die Reinigung der Sanguinarin-Reduktase war das Präzipitat der Fällung mit 40 - 80 % Ammoniumsulfat. In dieser Fraktion war neben der Reduktion von Sanguinarin auch die Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase nachweisbar, d. h. die Oxidation von Dihydrosanguinarin. Dieses Enzym ist bereits aus Arbeiten von Schumacher und Zenk [1988] sowie Arakawa *et al.* [1992] bekannt. Die Abtrennung der Oxidase war eines der ersten Ziele des folgenden Trennungsgangs, da dieses Enzym den Nachweis der Reduktase-Aktivität durch Reoxidation des gebildeten Dihydrosanguinarins stören würde.

Die Oxidation von Dihydrosanguinarin war interessanterweise nicht im 100 000 g-Überstand, sondern erst nach Abtrennung niedermolekularer Bestandteile durch Ultrafiltration (Abb. 16) oder durch Ammoniumsulfat-Fällung meßbar. Dies weist auf die Anwesenheit eines niedermolekularen Hemmstoffs hin. Die wahrscheinlichen Kandidaten sind das im Aufarbeitungspuffer enthaltene DTE sowie das im Zellextrakt zu erwartende Glutathion. Letzteres führte bei Zusatz (5 mM) zur > 30 kDa-Fraktion innerhalb von 10 min zu einer 50%igen Hemmung der Oxidation von 7 µM Dihydrosanguinarin. Inhibitorische Effekte durch Glutathion, DTT sowie Mercaptoethanol wurden für die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase bereits durch Arakawa *et al.* [1992] beschrieben.

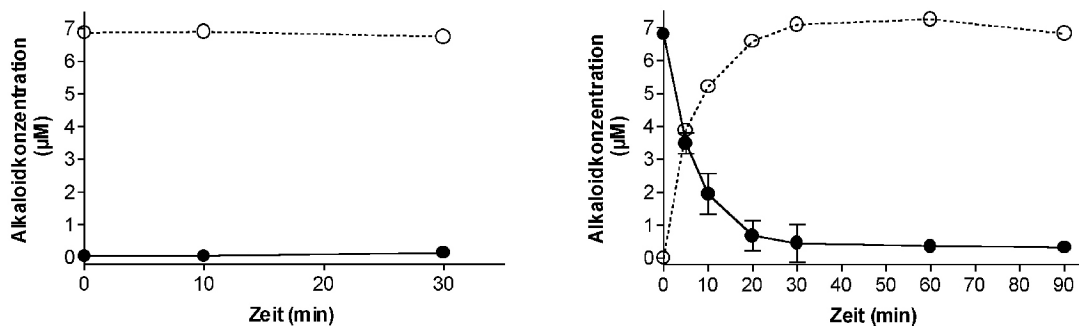
In der > 30 kDa-Proteinfraktion wurde gezeigt, daß das Enzym tatsächlich in der Lage ist, das aus zugesetztem Sanguinarin gebildete Dihydroalkaloid zu reoxidieren (Abb. 16). Im Verlauf der FPLC-Reinigung wird die Oxidase-Aktivität vollständig abgetrennt (s. Abb. 18).

Umfangreiche Vorversuche mit Hilfe verschiedener Trennmedien führten zu folgender Strategie für die Reinigung der Sanguinarin-Reduktase mittels FPLC:

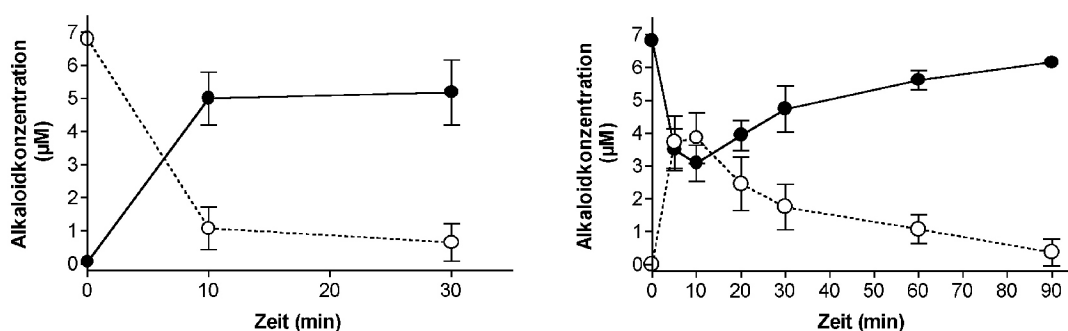
1. Herstellung eines 15 000 g-Überstandes,
2. Fällung von Nucleinsäuren mit Protaminsulfat,
3. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung,
4. Auftrennung der 40 - 80 %-Ammoniumsulfatfraktion durch Hydrophobe Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose 6 FF,
5. Entsalzung der mit 80 % Ammoniumsulfat gefällten aktiven Fraktionen mit Hilfe einer Sephadex G-25-Säule,
6. Auftrennung der proteinhaltigen Fraktionen am Anionenaustauscher Q Sepharose FF,
7. Separation und Entsalzung der mit 80 % Ammoniumsulfat gefällten aktiven Fraktionen durch Gelfiltration (Superdex 200 pg),
8. Trennung der aktiven Fraktionen am Anionenaustauscher Mono Q,
9. Bestimmung der Molekülmasse durch Gelfiltration (Superose 12).

Obwohl es sich bei der Sanguinarin-Reduktase offenbar um ein NAD(P)H-abhängiges Enzym handelt, bindet dieses nicht an die Trennmedien Red Sepharose und HiTrap Blue. Diese Materialien wurden für die Affinitätschromatographie von Enzymen entwickelt, welche Adeninnucleotide, z. B. NAD(P)<sup>+</sup> oder ATP, als Cosubstrate benötigen. Keramisches Hydroxyapatit sowie der Kationenaustauscher Mono S zeigten ebenfalls keine bzw. eine vernachlässigbar geringe Bindung der Enzymaktivität.

## 100 000 g-Überstand



## &gt; 30 kDa-Fraktion



**Abb. 16** Vergleich der Aktivitäten von Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase und Sanguinarin-Reduktase im 100 000 g-Überstand sowie in der > 30 kDa-Proteinfraction

Die Umsetzung von Dihydrosanguinarin bzw. Sanguinarin (je 7 µM) durch den 100 000 g-Überstand (Präparation s. 2.9; Proteingehalt: 1,16 mg/ml) sowie die > 30 kDa-Proteinfraction (Präparation s. 2.10.2; Proteingehalt: 0,83 mg/ml) wurde durch Fluoreszenzmessung untersucht (s. 2.10). Die Reduktion von Sanguinarin durch die > 30 kDa-Fraktion erfolgte in Anwesenheit von 5 mM GSH und 10 µM NADPH (Wie in Kap. 4.2.2 erläutert, ist eine Reduktion von Sanguinarin in der ultrafiltrierten Proteinfraction erst nach Zusatz von GSH plus NADP(H) meßbar, da die Aktivität der gleichzeitig anwesenden Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase das gebildete Dihydrosanguinarin sofort reoxidiert). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

- Sanguinarin
- Dihydrosanguinarin

### 3.4.2 FPLC-Reinigungsschritte

#### **Hydrophobe Interaktion: Phenylsepharose 6 FF**

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie eignet sich als erster Reinigungsschritt nach einer Ammoniumsulfatfällung, da die Proteine in einer Lösung hoher Salzkonzentration vorliegen. Mit abfallendem Ammoniumsulfat-Gradienten eluieren die Proteine, die zuvor an die mit Phenylresten überzogene Matrix gebunden wurden.

Abb. 17 zeigt das Elutionsverhalten der mit 40 - 80 % Ammoniumsulfat gefällten Proteinfraktion. In den Fraktionen 18 - 31 war sowohl die Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase als auch der Sanguinarin-Reduktase nachweisbar. Auffällig ist ein zweiter Aktivitätspeak der Reduktase, welcher bei niedriger Ionenstärke eluiert.

#### **Anionenaustauscher: Q Sepharose FF**

Die aktivsten Fraktionen aus Peak 1 der Phenylsepharose-Trennung wurden durch Fällung mit 80 % Ammoniumsulfat konzentriert und nachfolgend über eine Sephadex G-25-Säule (HiPrep 26/10 Desalting-Column) entsalzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung des Proteingemischs durch den Anionenaustauscher Q Sepharose FF. Ionische Wechselwirkungen durch Bindung der Proteine an quarternäre Ammoniumgruppen bilden hier ein gegensätzliches Trennprinzip zur vorhergehenden Hydrophoben Interaktion. In Abb. 18 ist eine Übersicht der Q Sepharose FF-Trennung dargestellt. Dieser Schritt zeigt deutlich eine Abtrennung der Sanguinarin-Reduktase von der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase.

#### **Gelfiltration: Superdex 200 pg**

Die durch Fällung mit 80 % Ammoniumsulfat konzentrierten aktiven Fraktionen 24 - 33 der Q Sepharose-Trennung wurden im folgenden einer Gelfiltration auf Superdex 200 prep grade unterzogen (Abb. 19). Gleichzeitig diente dieser Reinigungsschritt der Entsalzung.

#### **Anionenaustauscher: Mono Q**

Die vereinigten aktiven Fraktionen 40 - 45 der Gelfiltration wurden in einem zweiten Anionenaustauschschritt aufgetrennt. Durch Bindung der Sanguinarin-Reduktase an eine Mono Q-Säule gelang es, die Hauptaktivität auf 3 Fraktionen (6 - 8) à 1 ml zu konzentrieren (Abb. 20). Die proteinreichste Fraktion 7 wurde für den letzten Reinigungsschritt, eine Gelfiltration auf Superose 12, ausgewählt.



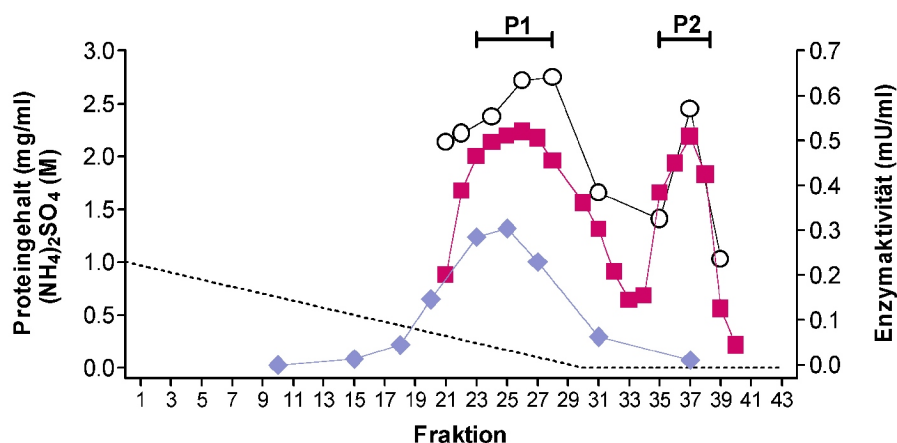


Abb. 17 Hydrophobe Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose 6 FF

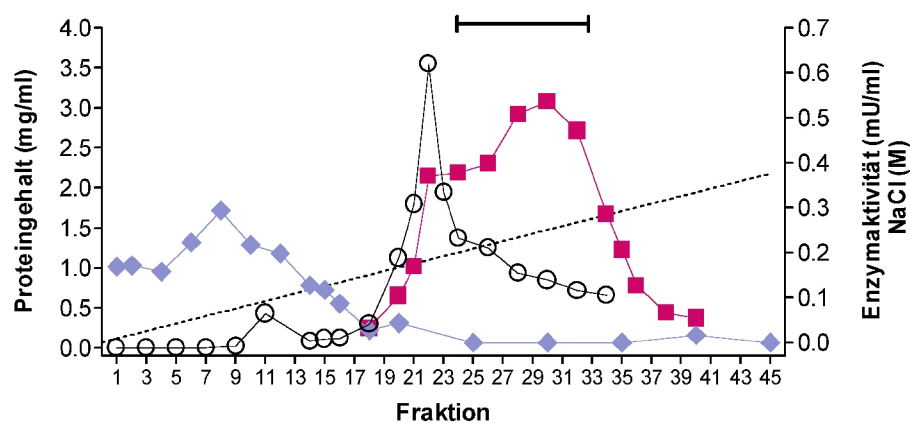
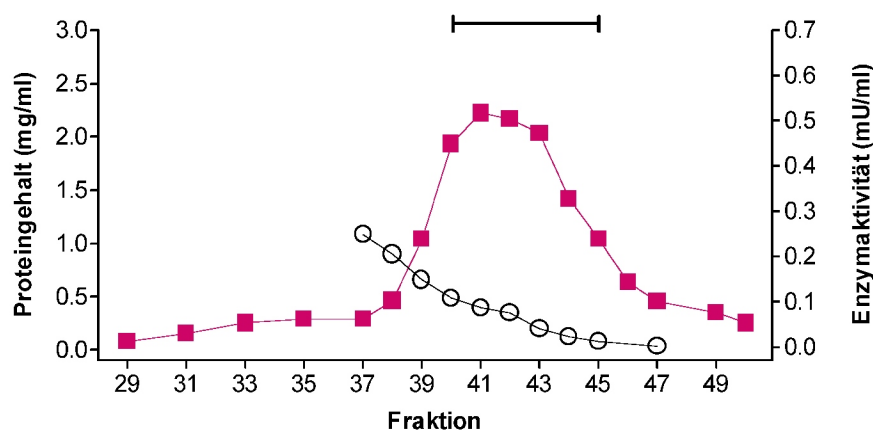


Abb. 18 Anionenaustauschchromatographie auf Q Sepharose FF

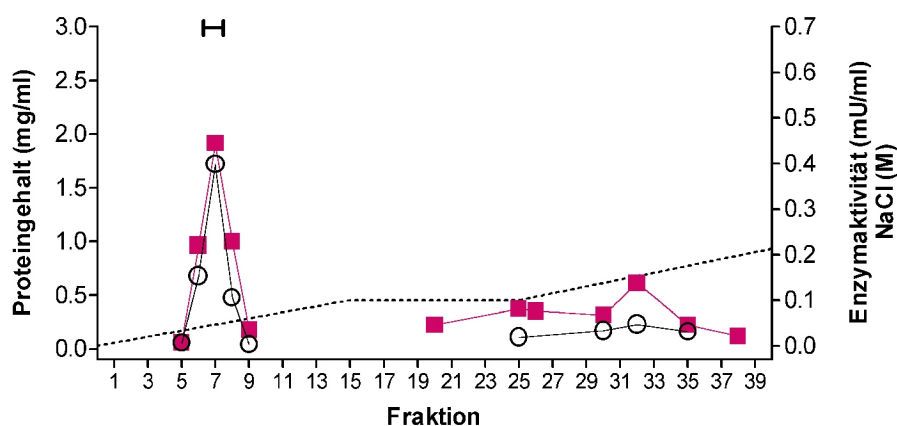
Die mit 40 - 80 % Ammoniumsulfat gefällte Proteinfraction wurde auf einer Phenylsepharose-Säule aufgetrennt (Abb. 17, s. 2.11.3). Die aktivsten Fraktionen aus P1 (Markierung s. Abb. 17) wurden entsalzt und nachfolgend auf dem Anionenaustauscher Q Sepharose FF getrennt (Abb. 18, s. 2.11.3). Hierbei erfolgte die Abtrennung der Sanguinarin-Reduktase-Aktivität von der Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten (s. 2.12.1 u. 2.12.2.) wurde mit folgenden Endverdünnungen der Fraktionen durchgeführt: Sanguinarin-Reduktase 1 : 250 (Abb. 17 und Abb. 18); Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase 1 : 25 (Abb. 17) bzw. unverdünnt (Abb. 18). Dargestellt ist das in 10 min umgesetzte bzw. gebildete Sanguinarin.

- Sanguinarin-Reduktase (Substrate: 7  $\mu$ M Sanguinarin plus 40  $\mu$ M NADH)
  - ◆ Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (Substrat: 7  $\mu$ M Dihydrosanguinarin)
  - Proteingehalt
  - Gradient der  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - bzw. NaCl-Konzentration
- Die mit  $\text{---}$  bezeichneten Fraktionen wurden für den nachfolgenden Reinigungsschritt verwendet.



**Abb. 19** Gelfiltration auf **Superdex 200 pg**



**Abb. 20** Anionenaustauschchromatographie auf **Mono Q**

Die mit 80 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konzentrierten, aktiven Fraktionen der Q Sepharose FF-Trennung (Markierung s. Abb. 18) wurden durch Gelfiltration weiter aufgetrennt (Abb. 19, s. 2.11.3). Anschließend erfolgte eine Reinigung der aktiven Fraktionen der Superdex-Trennung auf einer Mono Q-Säule (Abb. 20, s. 2.11.3).

Die Bestimmung der Sanguinarin-Reduktase-Aktivität (s. 2.12.1) wurde mit folgenden Endverdünnungen der Fraktionen durchgeführt: 1 : 250 (Abb. 19) bzw. 1 : 2500 (Abb. 20).

Dargestellt ist das in 10 min umgesetzte Sanguinarin.

- Sanguinarin-Reduktase (Substrate: 7  $\mu\text{M}$  Sanguinarin plus 40  $\mu\text{M}$  NADH)
- Proteingehalt
- ..... Gradient der NaCl-Konzentration

Die mit **H** bezeichneten Fraktionen wurden für den nachfolgenden Reinigungsschritt verwendet.

### **Gelfiltration - Superose 12**

Die Gelfiltration auf Superose 12 (Abb. 21A) ermöglichte die Abtrennung weiterer Proteine, wie aus der abschließenden SDS-Gelelektrophorese hervorgeht (Abb. 22). Zugleich wurde dieser Reinigungsschritt zur Bestimmung der Molekülmasse der Sanguinarin-Reduktase verwendet (s. 3.4.3).

Die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Aus einer eingesetzten Proteinmenge von 4,8 g wurden 200 µg des gereinigten Sanguinarin-Reduktase-Proteins erhalten. Diese zeigten 0,5 % der Gesamtzymaktivität. Die spezifische Aktivität der Reduktase wurde um den Faktor 130 angereichert.

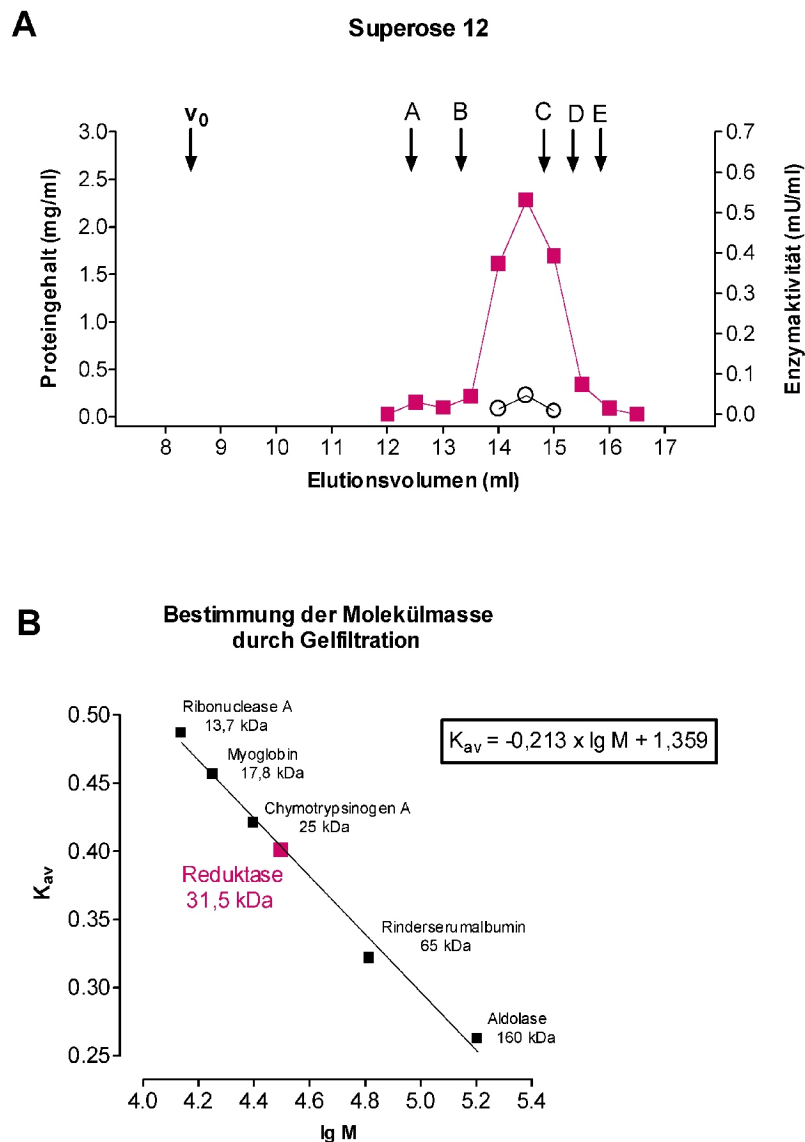
In ähnlicher Weise wie für die Fraktion P1 der Phenylsepharose-Trennung beschrieben, wurde auch die Proteinfraction P2 gereinigt, wobei die Trennung auf Q Sepharose FF übersprungen wurde. Bei allen weiteren Trennungen (Gelfiltration auf Superdex 200 pg sowie Anionenaustauschchromatographie auf Mono Q) zeigten die beiden Ausgangsfraktionen P1 und P2 übereinstimmende Trenneigenschaften. Nach SDS-Gelelektrophorese wurde eine Proteinbande von 33,9 kDa detektiert, welche noch von einigen weiteren Proteinen verunreinigt war. Vermutlich handelt es sich um ein Isoenzym der aus P1 isolierten Sanguinarin-Reduktase oder um ein Artefakt der Phenylsepharose-Trennung.

### **3.4.3 Bestimmung der Molekülmasse**

Die SDS-Gelelektrophorese des gereinigten Enzyms (aus der Proteinfraction P1 der Phenylsepharose-Trennung, s. 3.4.2) zeigt eine Bande bei  $33,4 \pm 0,5$  kDa ( $n = 5$ ); weitere Proteine sind nicht detektierbar (Abb. 22 und 32). Durch eine HPLC/MS-Untersuchung der gereinigten Sanguinarin-Reduktase wurde eine Molekülmasse von 29 432 Da ermittelt.

Ergänzend zur Bestimmung der Molekülmasse wurde die Gelfiltration auf Superose 12 eingesetzt. Abb. 21A zeigt neben dem Peak der Reduktase die Elutionsvolumina von 5 Referenzproteinen (A - E). Durch Auftragen des jeweiligen Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  gegen den Logarithmus der Molekülmasse läßt sich für die Sanguinarin-Reduktase eine Molekülmasse von ca. 31,5 kDa ermitteln (Abb. 21B).

Die Bestimmung der Molekülmasse sowohl des aktiven als auch des durch SDS denaturierten Proteins liefern vergleichbare Molekülgrößen. Dies spricht dafür, daß die Sanguinarin-Reduktase aus einem einzelnen Protein besteht.



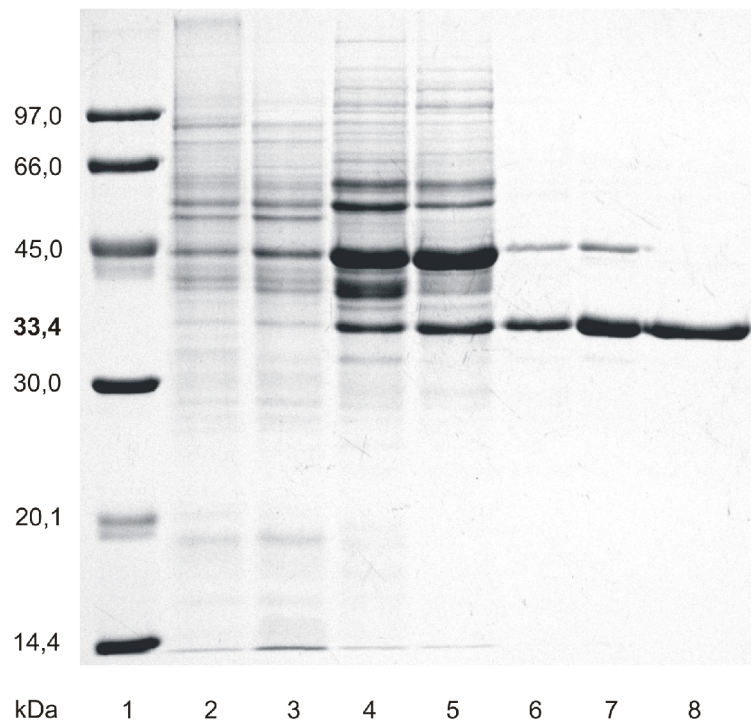
**Abb. 21** Gelfiltration und Bestimmung der Molekülmasse auf Superose 12

- A) 200  $\mu$ l der aktiven Fraktion 7 der Mono Q-Trennung (s. Abb. 20) wurden auf einer Superose 12-Säule aufgetrennt (s. 2.11.3). Parallel wurden Elutionsvolumina verschiedener Referenzproteine bestimmt (s. 2.14): **A**-Aldolase, **B**-Rinderserumalbumin, **C**-Chymotrypsinogen A, **D**-Myoglobin, **E**-Ribonuclease A. Das Ausschlußvolumen der Säule ( $v_0$ ), welches zur Berechnung der Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  (s. 2.14) benötigt wird, wurde durch Auftragen von Dextranblau ermittelt.
- Zur Bestimmung der Sanguinarin-Reduktase-Aktivität (s. 2.12.1) wurden die Fraktionen in einer Endverdünnung von 1 : 250 eingesetzt. Dargestellt ist das in 10 min umgesetzte Sanguinarin. Die Proteinfraction mit der höchsten Reduktase-Aktivität (Fraktion 29) wurde zur massenspektrometrischen Analyse eingesetzt.
- B) Aus den nach (A) ermittelten Elutionsvolumina wurde eine Eichkurve durch Auftragung der Verteilungskoeffizienten ( $K_{av}$ ) erstellt und durch Extrapolation die Molekülmasse (M) der Sanguinarin-Reduktase bestimmt.

- Sanguinarin-Reduktase (Substrate: 7  $\mu$ M Sanguinarin plus 40  $\mu$ M NADH)
- Proteingehalt

**Tab. 8** Reinigungstabelle der Sanguinarin-Reduktase

	<b>Gesamtprotein (mg)</b>	<b>Gesamtaktivität (mU)</b>	<b>Ausbeute (%)</b>	<b>spezifische Aktivität (mU/mg)</b>	<b>Anreicherung</b>
Rohextrakt	4800	67 200	100	14	1
40 - 80 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fraktion	3330	63 270	94	19	1,4
Phenylsepharose 6 FF	300	13 800	21	46	3
Q Sepharose FF	95	10 170	15	107	8
Superdex 200 pg	13	5450	8	419	30
Mono Q	3	2215	3	738	53
Superose 12	0,2	364	0,5	1820	130

**Abb. 22** SDS-PAGE der aktiven Sanguinarin-Reduktase-Fractionen in verschiedenen Reinigungsstufen

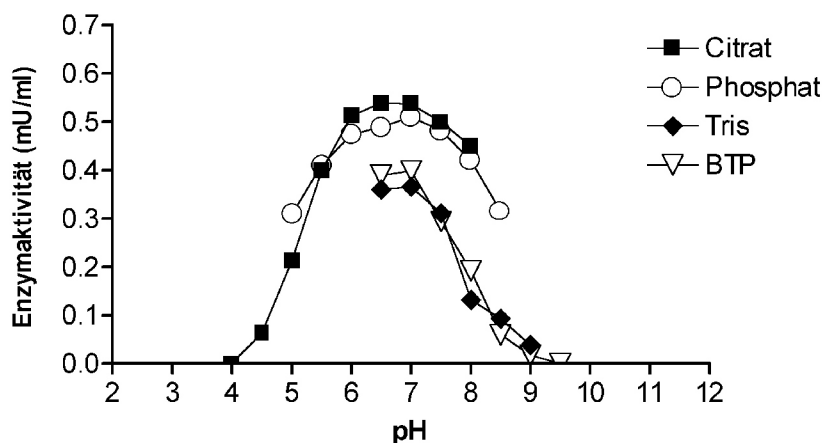
Über ein 12%iges Polyacrylamidgel wurden jeweils 15 µg Protein (2 - 5) bzw. 3 µg (6 - 8) der verschiedenen Reinigungsschritte aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (s. 2.13). Aus den Rf-Werten der Standardproteine wurde durch Extrapolation die Molekülmasse der gereinigten Sanguinarin-Reduktase ermittelt.

- 1:** Standardproteine, **2:** Rohextrakt, **3:** 40 - 80 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fraktion,  
**4:** Phenylsepharose 6 FF (Fraktionen 23 - 28), **5:** Q Sepharose FF (Fraktionen 24 - 33),  
**6:** Superdex 200 pg (Fraktionen 40 - 45), **7:** Mono Q (Fraktion 7),  
**8:** Superose 12 (Fraktion 29)

### 3.5 Eigenschaften der Sanguinarin-Reduktase

#### 3.5.1 Optimaler pH-Bereich

Die Bestimmung der Aktivität der Reduktase bei verschiedenen pH-Werten ergab ein Optimum für Sanguinarin in der Nähe von pH 7,0 (Abb. 23). Dies unterstützt die Annahme, daß es sich um ein cytosolisches, nicht um ein vakuoläres Enzym handelt.



**Abb. 23** Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der Sanguinarin-Reduktase

Die Aktivität des FPLC-gereinigten Enzyms (Fraktion 44 der Superdex-Trennung, s. Abb. 19) wurde mit dem unter 2.12.1 beschriebenen Assay in verschiedenen Puffersystemen untersucht. Endkonzentrationen: 50 mM Puffer; 0,52  $\mu\text{g/ml}$  Protein; 40  $\mu\text{M}$  NADH; 7  $\mu\text{M}$  Sanguinarin; dargestellt ist das in 10 min umgesetzte Sanguinarin.

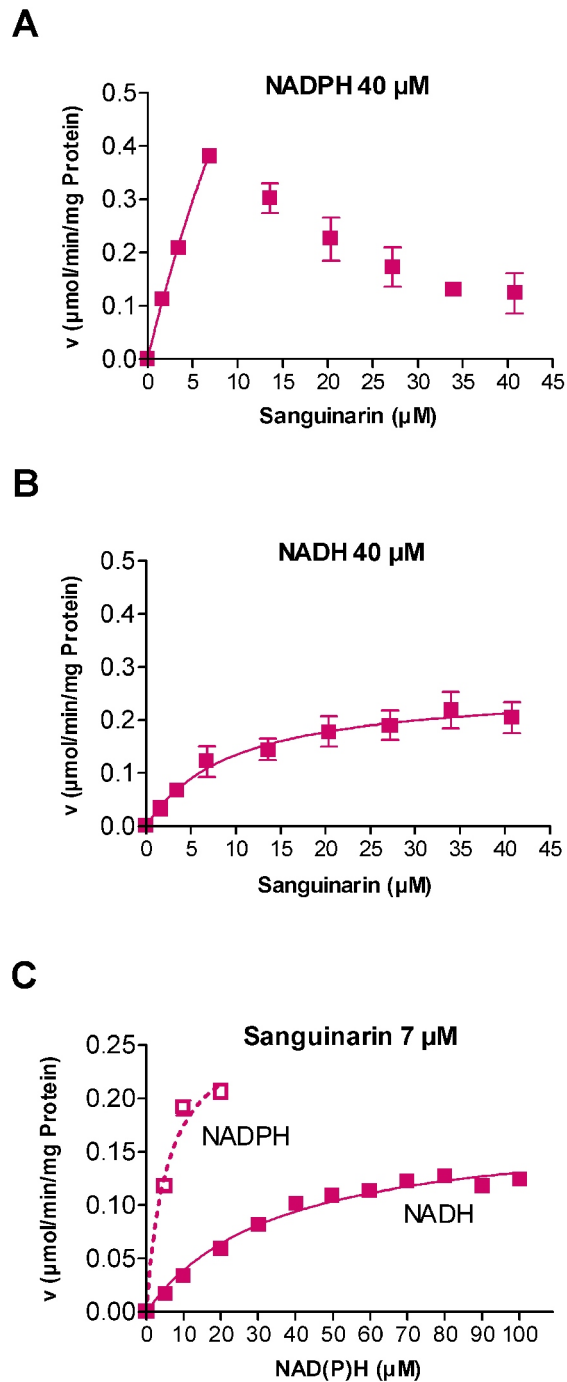
#### 3.5.2 Einfluß der Substratkonzentration auf die Umsetzung von Sanguinarin

Wie aus Abb. 24A-C hervorgeht, wird mit dem Cosubstrat NADPH eine deutlich höhere Umsatzrate von Sanguinarin als mit NADH erreicht. Bei Benutzung von NADPH als Elektronendonator (Abb. 24A) wird jedoch bei Alkaloidkonzentrationen  $> 7 \mu\text{M}$  ein deutlicher Abfall der Umsatzrate gegenüber niedrigen Alkaloidkonzentrationen sichtbar. Bei 40  $\mu\text{M}$  werden nur noch ca. 30 % der maximal meßbaren Rate (bei 7  $\mu\text{M}$ ) gefunden. Dies spricht dafür, daß das Substrat Sanguinarin bei höheren Konzentrationen einen hemmenden Einfluß auf die Sanguinarin-Reduktase ausübt. Da im Enzymmolekül 2 Cysteine zu erwarten sind (s. 3.5.4), ist dieser Befund gut vereinbar mit der bekannten hemmenden Wirkung des Sanguinarins auf SH-enhaltende Enzyme (s. 1.3.3.1).

Bei Benutzung von NADH als Elektronendonator (Abb. 24B) führen steigende Alkaloidkonzentrationen zu einem gegenüber NADPH langsameren, kontinuierlichen Anstieg der Umsatzrate, welche bei ca. 40  $\mu\text{M}$  Sanguinarin einen Sättigungswert erreicht. Vergleicht man die bei hohen Alkaloidkonzentrationen erreichten Umsatzraten, so wird in Gegenwart von NADH bei sättigenden Sanguinarinkonzentrationen eine höhere Umsatzrate erreicht als bei gleicher Sanguinarinkonzentration in Gegenwart von NADPH. Da die toxische Wirkung des Sanguinarins in beiden Fällen gleich sein sollte, muß man annehmen, daß auch das Endprodukt Dihydrosanguinarin einen Hemmeffekt auf die Umsetzung ausübt. Da mit NADPH die Umsetzung wesentlich rascher abläuft (Abb. 24C, unterer Konzentrationsbereich), also mehr Produkt pro Zeiteinheit entsteht, kommt die Hemmwirkung möglicherweise durch die Akkumulation des Dihydrosanguinarins zustande.

Wie in Tab. 9 gezeigt, katalysiert die Sanguinarin-Reduktase nicht die Reoxidation des gebildeten Dihydrosanguinarins, so daß die Einstellung eines Reduktions-Oxidations-Gleichgewichtes nicht als Ursache für das Absinken der Sanguinarin-Umsetzung in Frage kommt. Aus den oben genannten Gründen erschien die Bestimmung von kinetischen Konstanten der Reduktase ( $K_M$ ,  $V_{\max}$ ) wenig sinnvoll, da bisher nicht zwischen der eigentlichen Umsetzung des Sanguinarins und seiner Hemmwirkung unterschieden werden kann.

Um die Stöchiometrie der enzymatischen Umsetzung zwischen NAD(P)H und Sanguinarin zu charakterisieren, war eine Messung des verbrauchten Cosubstrates während der Reduktion von Sanguinarin erforderlich. Der in solchen Fällen oft verwendete optische Test für NAD(P)H konnte auf Grund der Eigenabsorption sowohl des Sanguinarins als auch des Dihydrosanguinarins bei 340 nm nicht durchgeführt werden (Abb. 25). Deshalb wurde die Quantifizierung des NADPH durch eine Diaphorase-katalysierte Umsetzung mit dem Farbstoff Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT) durchgeführt, wodurch die Detektion in den sichtbaren Bereich (500 nm) verlegt wurde. Dabei konnte eine 1 : 1-Stöchiometrie von NADPH-Verbrauch und Sanguinarin-Umsetzung festgestellt werden (Abb. 26A). Zusammen mit dem Nachweis der Entstehung einer äquimolaren Menge an Dihydrosanguinarin (Abb. 26A) berechtigt dieser Befund zur Annahme, daß das gefundene Enzym als Sanguinarin:NADPH-Oxidoreduktase arbeitet, d. h. eine Zwei-Elektronen-Übertragung katalysiert.



**Abb. 24** Abhängigkeit der Reduktase-Aktivität von der Konzentration an Sanguinarin bzw. NAD(P)H

Die Umsatzraten des FPLC-gereinigten Enzyms (Fraktion 39 der Superdex-Trennung, s. Abb. 19) wurden mit dem unter 2.12.1 aufgeführten Assay unter folgenden Bedingungen untersucht:

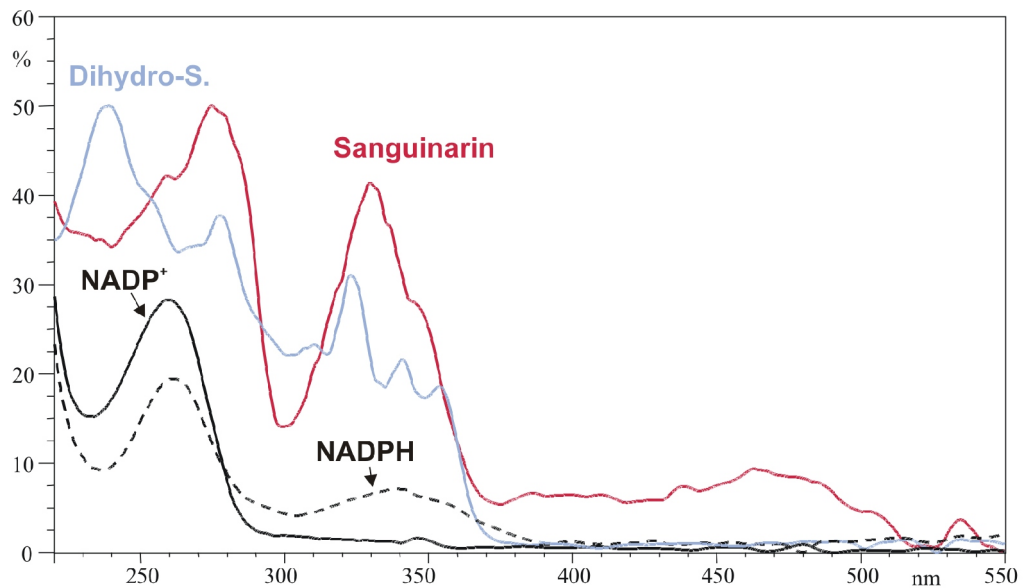
Endkonzentrationen: 10 mM Tris/PMSF - pH 7,5; 2,64  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protein

A + B: 40  $\mu\text{M}$  NAD(P)H; 1,7 - 40,8  $\mu\text{M}$  Sanguinarin; Reaktionszeit 5 min

C: 7  $\mu\text{M}$  Sanguinarin; 5 - 20  $\mu\text{M}$  NADPH, 5 - 100  $\mu\text{M}$  NADH; Reaktionszeit 10 min.

Dargestellt ist jeweils das umgesetzte Sanguinarin als Mittelwert  $\pm$  SD aus 5 (A + B) bzw. 3 (C) voneinander unabhängigen Versuchen.





**Abb. 25** UV-Absorptionsspektren der Substrate bzw. Endprodukte des Sanguinarin-Reduktase-Assays

Mit dem Detektor UVD 340 der HPLC-Anlage (Gynkotek) wurden UV-Absorptionsspektren von Sanguinarin, Dihydrosanguinarin, NADP<sup>+</sup> sowie NADPH zwischen 200 und 600 nm aufgenommen. Die Alkaloide wurden auf einer RP-18-Säule getrennt (s. 2.5.2); NADP<sup>+</sup> und NADPH wurden ohne vorherige Trennung in den Detektor injiziert. Das Verhältnis der eingesetzten Substratkonzentrationen wurde dem Reduktase-Assay (7  $\mu$ M Alkaloid, 40  $\mu$ M Cosubstrat; s. 2.12.1) angepaßt.

**Abb. 26** Nachweis der stöchiometrischen Umsetzung von Benzophenanthridinen und NADPH durch die Sanguinarin-Reduktase

Die Umsetzung der Alkaloide durch das gereinigte Enzym (Fraktion 39 der Superdex-Trennung, s. Abb. 19) und die dafür verbrauchte Menge an NADPH wurde aus demselben Reaktionsansatz bestimmt (INT/Diaphorase-Farbttest, s. 2.12.3). Die Quantifizierung der Alkaloidgehalte erfolgte durch Fluoreszenzmessung nach 2.12.1.

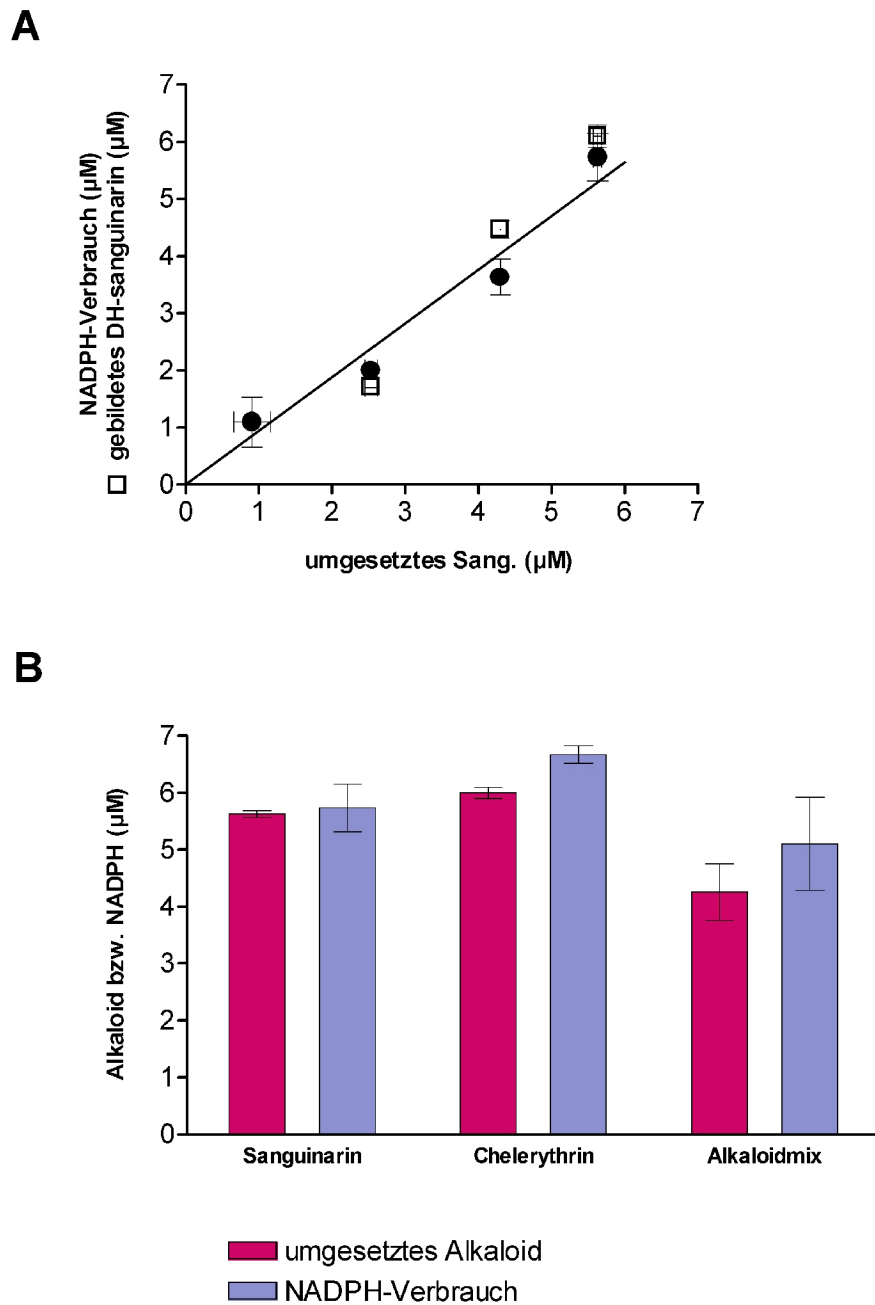
Endkonzentrationen: 50 mM Tris - pH 7,0; 2,64 µg/ml Protein; 20 µM NADPH

A) Inkubation mit 1,7; 3,4; 5,4; 6,8 µM Sanguinarin

B) Inkubation mit jeweils 7 µM Sanguinarin, Chelerythrin bzw. isolierter Alkaloidmischung

\* Die Alkaloidmischung (Herstellung s. 2.5.1.3) enthält Bestandteile, welche nichtenzymatisch mit NADPH reagieren. Um den vollständigen Abzug der nichtenzymatisch reagierenden Anteile vom Gesamtverbrauch an NADPH zu ermöglichen, wurde eine erhöhte Ausgangskonzentration (40 µM NADPH) verwendet. Die unter den oben angegebenen Bedingungen geringe Umsatzrate der Alkaloidmischung (in Anwesenheit von 40 µM NADPH) wurde durch Erhöhung der Proteinkonzentration auf 13 µg/ml gesteigert und ist in Abb. 26B dargestellt.

Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Versuchen.



**Abb. 26** Nachweis der stöchiometrischen Umsetzung von Benzophenanthridinen und NADPH durch die Sanguinarin-Reduktase

- A) Sanguinarin-Umsetzung, NADPH-Verbrauch und Dihydro-sanguinarin-Bildung bei steigender Sanguinarin-Konzentration
- B) Äquimolare Umsetzung des NADPH bei der Reduktion verschiedener Benzophenanthridine

### 3.5.3 Substratspezifität der Sanguinarin-Reduktase-Reaktion

#### 3.5.3.1 Vergleichende Untersuchungen in Proteinmischungen unterschiedlicher Komplexität

Wie in Kap. 3.2 dargestellt, besitzen intakte Zellen von *E. californica* ein höheres Reduktionsvermögen für Sanguinarin als für andere Benzophenanthridine. Diese Selektivität der Reduktion verschwindet im 100 000 g-Überstand, d. h. verschiedene Benzophenanthridine werden mit gleicher Geschwindigkeit reduziert wie Sanguinarin (Abb. 27B). Die Präferenz für Sanguinarin taucht jedoch wieder auf, nachdem die lösliche Proteinfraction durch Ultrafiltration fraktioniert wurde (Abb. 27C). Das FPLC-gereinigte Enzym zeigt eine nahezu identische Substratspezifität der Reduktion wie die Ganzzellen (Abb. 27A, D).

#### 3.5.3.2 Umsatzraten der Reduktion Sanguinarin-ähnlicher Alkaloide

Aus Abb. 27D geht hervor, daß **Chelerythrin**, ein dem Sanguinarin strukturell eng verwandtes Benzophenanthridin (vgl. Abb. 13), durch das gereinigte Enzym mit einer hohen Rate (68 % der Sanguinarin-Umsetzung) reduziert wird. Die Umsetzung der Benzophenanthridine Sanguinarin und Chelerythrin durch die Sanguinarin-Reduktase wurde durch massenspektrometrische Nachweise der Substratabnahme sowie der Produktbildung verifiziert (Abb. 28).

**Höher substituierte Benzophenanthridine** werden durch die gereinigte Reduktase nicht oder nur mit sehr geringen Raten umgesetzt. Dies wurde bei Benutzung einer aus elicitierten Zellkulturen isolierten Alkaloidmischung gezeigt, welche vor allem 10-Hydroxychelerythrin, Chelirubin sowie Macarpin enthält (Abb. 27D).

Die Reduktion von Chelerythrin ergab folgende Gemeinsamkeiten mit der Umsetzung des Sanguinarins:

- In Anwesenheit niedriger Konzentrationen der Elektronendonatoren ( $< 20 \mu\text{M}$ ) erlaubt NADPH eine höhere Umsatzrate als NADH (Abb. 29C).
- Das Absinken der Umsatzraten in Gegenwart von Chelerythrin  $> 7 \mu\text{M}$  widerspiegelt hemmende Effekte auch dieses Substrates auf die Reduktase in Anwesenheit von NADPH (Abb. 29A). Bei Benutzung des Cosubstrates NADH wurde erneut keine Substrathemmung festgestellt (Abb. 29B).
- Eine Reoxidation von Dihydrochelerythrin ( $26 \mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von 40 bzw.  $80 \mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup> durch die Sanguinarin-Reduktase wurde durch Fluoreszenzmessungen ausgeschlossen.

---

Auffällig ist, daß Chelerythrin durch NADH rascher reduziert wird als Sanguinarin, während NADPH umgekehrt mit Sanguinarin höhere Umsatzraten ermöglicht (Abb. 29C). Da in Ganzzellen Sanguinarin deutlich schneller umgesetzt wird als Chelerythrin (s. 3.2), spricht dies für NADPH als dem vorrangig benutzten Elektronendonator<sup>1</sup>.

Für die Reduktion von Chelerythrin sowie der isolierten Alkaloidmischung wurde in Analogie zu Sanguinarin eine äquimolare Umsetzung mit NADPH nachgewiesen (Abb. 26B).

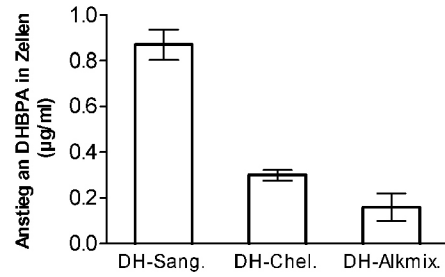
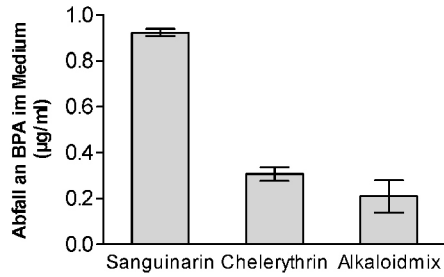
---

<sup>1</sup> Aus Untersuchungen in Spinat- und Gerstenblättern ist bekannt, daß die Konzentration an reduziertem NADPH im Cytosol etwa 150 - 200  $\mu\text{M}$  beträgt, während die cytosolische Konzentration an reduziertem NADH auf 1  $\mu\text{M}$  geschätzt wird (vgl. Møller [2001] und dort zitierte Referenzen).

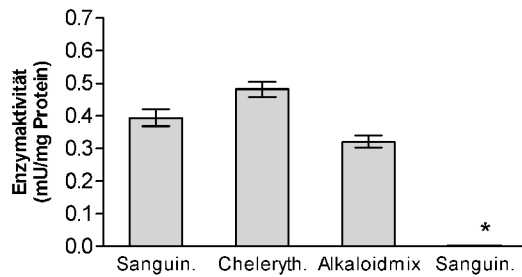
**Abb. 27** Spezifität der Reduktion

- A: Zellsuspensionen (70 mg FM/ml) wurden mit den angegebenen Benzophenanthridinen inkubiert (vgl. Abb. 14A, 2.3) und der Abfall der Benzophenanthridin-Konzentration im Medium (links dargestellt) sowie der parallele Anstieg der DH-Benzophenanthridine in den Zellen derselben Suspension (rechts) durch HPLC-Analyse ermittelt. Die Daten für Sanguinarin und Chelerythrin stammen aus Abb. 14A. Die Daten für den Alkaloidmix entsprechen dem Mittelwert der mit einer Mischung aus 10-Hydroxychelerythrin, Chelirubin und Macarpin erhaltenen Werte (vgl. Abb. 14A).
- B, C, D: Nach Zusatz von jeweils 7  $\mu\text{M}$  Alkaloid wurde die Umsetzung der Benzophenanthridine innerhalb von 10 min in folgenden Proteinfractionen untersucht:
- B) 100 000 g-Überstand, Präparation s. 2.9; Assay s. 2.10.1; Proteingehalt: 1,17 mg/ml
- C) > 30 kDa-Proteinfraktion, Präparation und Assay s. 2.10.2 (5 mM GSH plus 10  $\mu\text{M}$  NADPH); Proteingehalt: 0,76 mg/ml
- D) FPLC-gereinigtes Enzym (Fraktion 39 der Superdex-Trennung, s. Abb. 19); Assay s. 2.12.1 (10  $\mu\text{M}$  NADPH); Proteingehalt: 2,64  $\mu\text{g/ml}$
- D: Die Umsetzung der Benzophenanthridine ist links, die parallele Bildung der Dihydrobenzophenanthridine rechts dargestellt.
- \* Das bei der Zellfraktionierung (s. 2.9) erhaltene, mit Resuspensionspuffer (s. 2.9) gewaschene Mikrosomale Pellet (350  $\mu\text{g/ml}$  Protein) wurde ebenfalls auf Reduktion von Sanguinarin überprüft. Dabei wurde weder ein Abfall an quarternärem Sanguinarin noch ein Anstieg an Dihydroalkaloid gemessen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

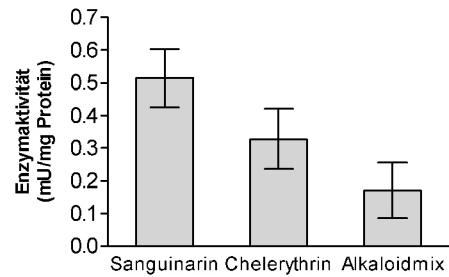
### A Zellsuspension



### B 100 000 g-Überstand



### C > 30 kDa-Fraktion



### D FPLC-gereinigtes Enzym

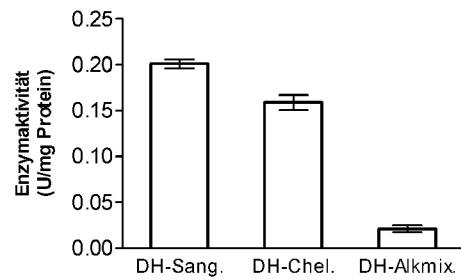
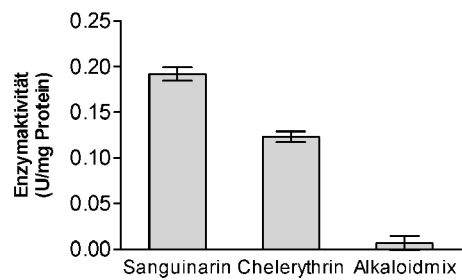
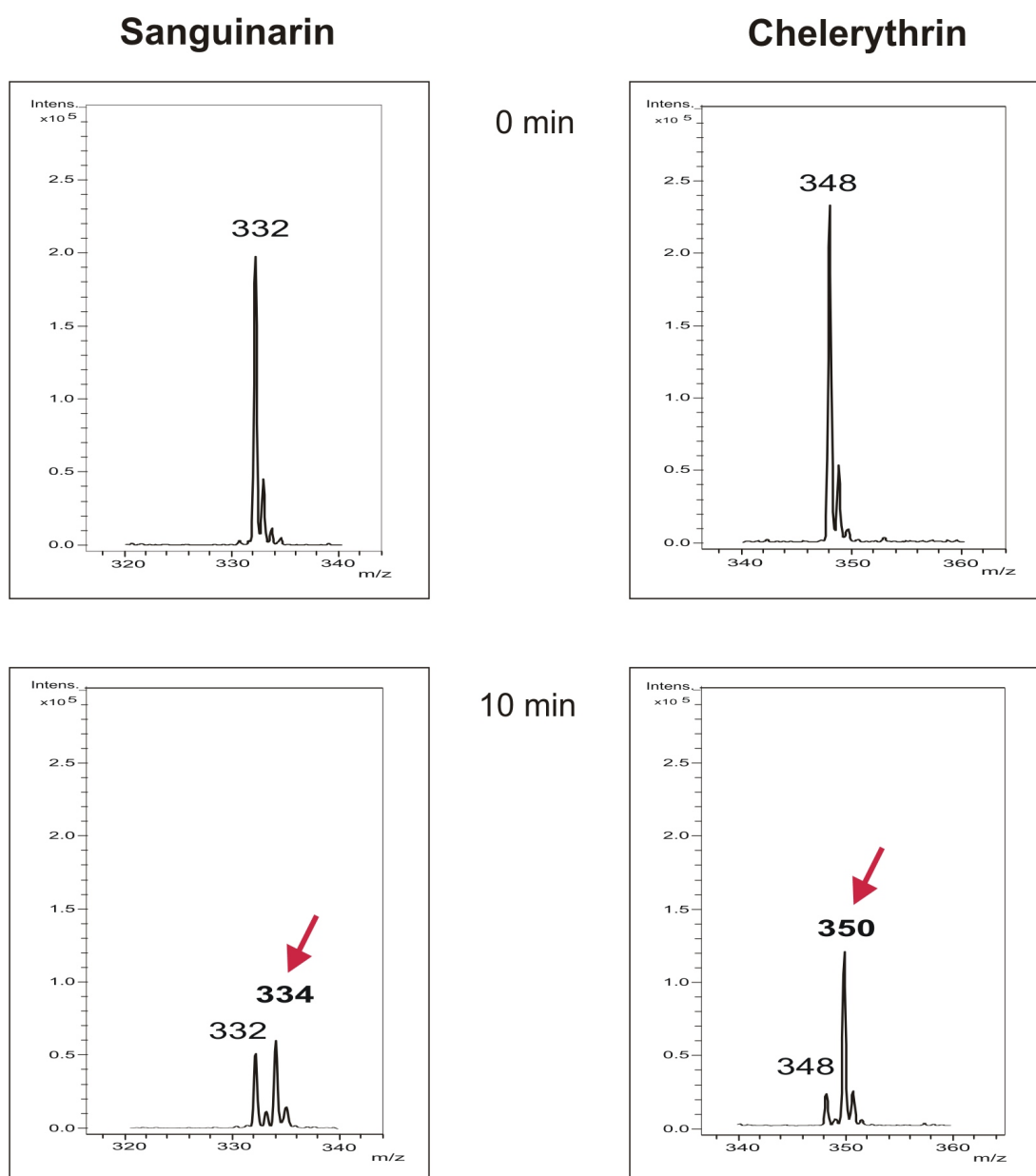


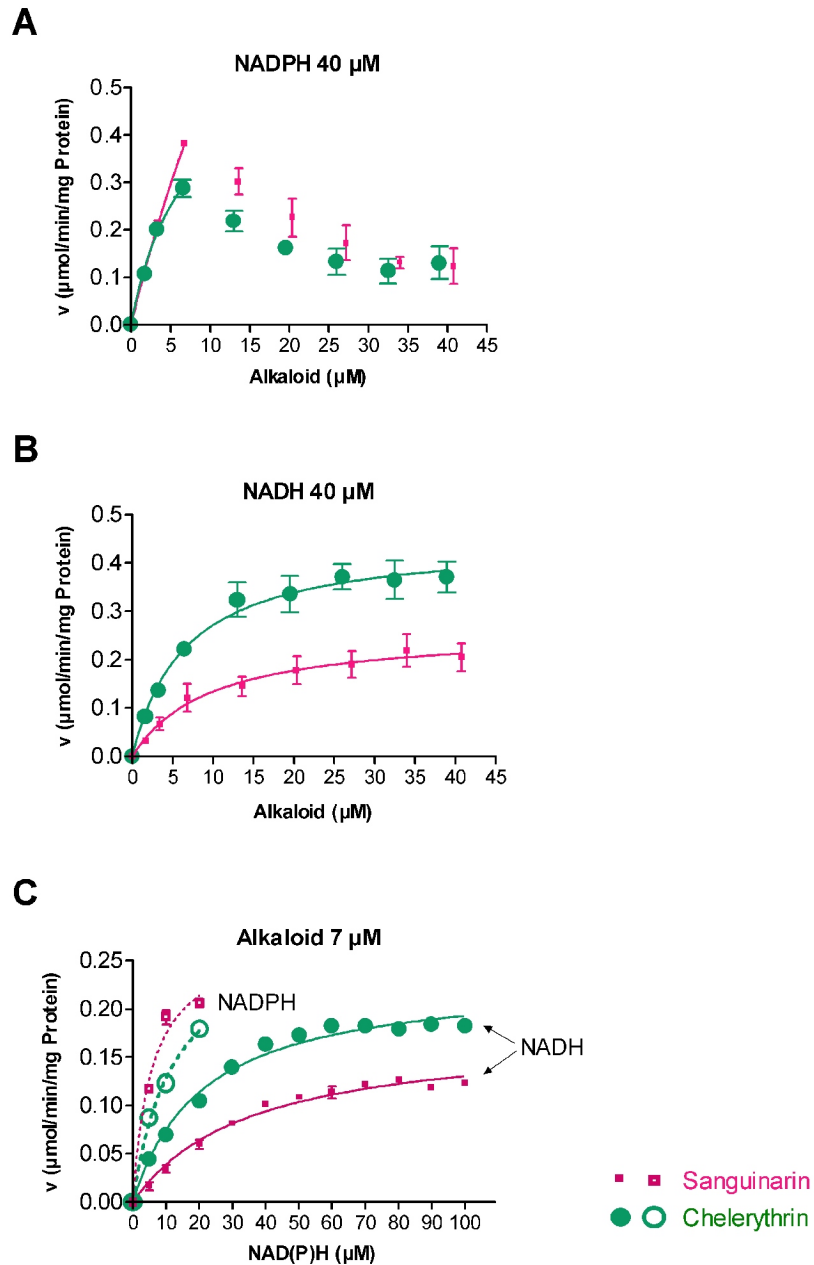
Abb. 27 Spezifität der Reduktion



**Abb. 28** Massenspektrometrischer Nachweis der Bildung von Dihydroanguinarin und Dihydrochelerythrin durch die Sanguinarin-Reduktase-Reaktion

Jeweils 7  $\mu\text{M}$  Sanguinarin ( $m/z$  332) bzw. Chelerythrin ( $m/z$  348) wurden mit dem gereinigten Enzym (Fraktion 39 der Superdex-Trennung, s. Abb. 19; 2,64  $\mu\text{g/ml}$  Protein) sowie 40  $\mu\text{M}$  NADPH versetzt (s. 2.12.1). Die Reaktionsgemische zum Zeitpunkt 0 bzw. 10 min wurden massenspektrometrisch untersucht (s. 2.5.2). Als Ionisierungsverfahren diente die Elektrospray-Ionisation (ESI), bei der nur wenige Fragmentationen entstehen. Die gebildeten ungeladenen Dihydrobenzophenanthridine wurden während der Analyse protoniert. Daraus ergibt sich jeweils eine Differenz von 2 zum Masse/Ladungsverhältnis der quarternären Alkaloide.





**Abb. 29** Abhängigkeit der Reduktase-Aktivität von der Konzentration an Alkaloid bzw. NAD(P)H

Die Umsatzraten des FPLC-gereinigten Enzyms (Fraktion 39 der Superdex-Trennung, s. Abb. 19) wurden mit dem unter 2.12.1 aufgeführten Assay unter folgenden Bedingungen untersucht:

Endkonzentrationen: 10 mM Tris/PMSF - pH 7,5; 2,64  $\mu\text{g/ml}$  Protein

A + B: 40  $\mu\text{M}$  NAD(P)H; 1,7 - 40,8  $\mu\text{M}$  Sanguinarin bzw. 1,6 - 39  $\mu\text{M}$  Chelerythrin;

Reaktionszeit 5 min

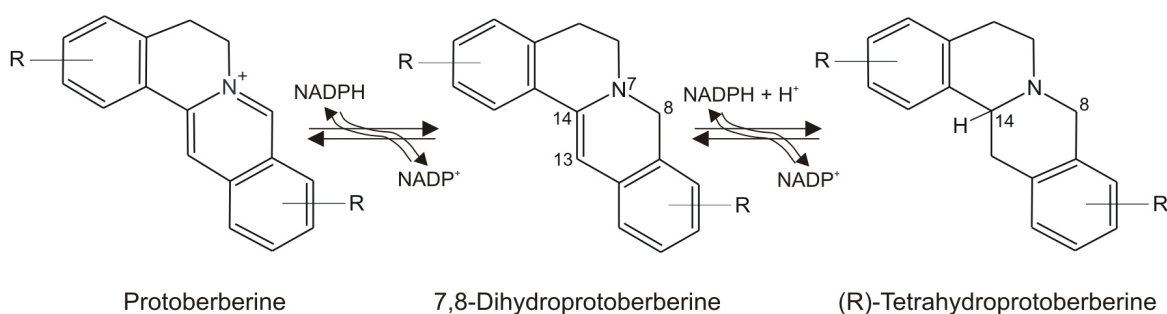
C: 7  $\mu\text{M}$  Sanguinarin bzw. Chelerythrin; 5 - 20  $\mu\text{M}$  NADPH, 5 - 100  $\mu\text{M}$  NADH;

Reaktionszeit 10 min

Dargestellt ist jeweils das umgesetzte Sanguinarin bzw. Chelerythrin als Mittelwert  $\pm$  SD aus 5 (A + B) bzw. 3 (C) voneinander unabhängigen Versuchen. Die Daten für die Umsetzung von Sanguinarin wurden aus Abb. 24 übernommen.

Zur weiteren Prüfung der Substratspezifität wurden verschiedene, dem Benzophenanthridin-Grundgerüst verwandte Verbindungen, u. a. das Isochinolin-Alkaloid Berberin (Abb. 31), mit der gereinigten Sanguinarin-Reduktase inkubiert.

Aus Untersuchungen in Knollen von *Corydalis cava* ist bekannt, daß Protoberberine, z. B. Berberin, in Anwesenheit von NADPH durch die Berberin-Reduktase (EC 1.5.1.31) stereospezifisch zu (R)-Tetrahydroderivaten reduziert werden (Abb. 30, [Bauer und Zenk 1991]).

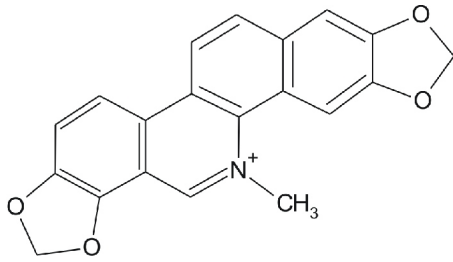


**Abb. 30** Reversible Umwandlung von Protoberberinen zu (R)-konfigurierten Tetrahydroprotoberberinen durch die Berberin-Reduktase  
Schema nach Bauer und Zenk [1991]

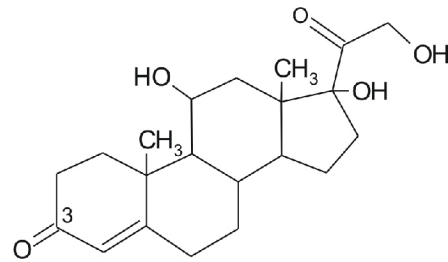
Mit dem aus *Eschscholzia californica* isolierten Enzym konnte weder ein Verbrauch an NADPH noch eine Umsetzung des Berberins festgestellt werden (Tab. 9).

Die synthetischen Phenanthridine Ethidiumbromid und Propidiumjodid (Abb. 31) werden von der Sanguinarin-Reduktase ebenfalls nicht umgesetzt (Tab. 9), obwohl deren chemische Reduktion durch Zusatz von Natriumborhydrid in Analogie zu den Benzophenanthridinen möglich ist. MS-Untersuchungen zeigen, daß dabei im Falle des Berberins das erwartete Tetrahydroderivat entsteht.

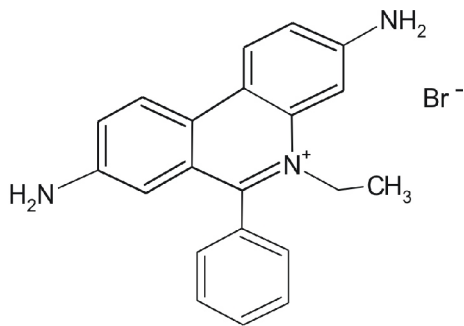
Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß die Abschirmung des quarternären Stickstoffs, z. B. durch Phenyl- sowie Alkylreste, die enzymatische Umsetzung durch die Sanguinarin-Reduktase verhindert.



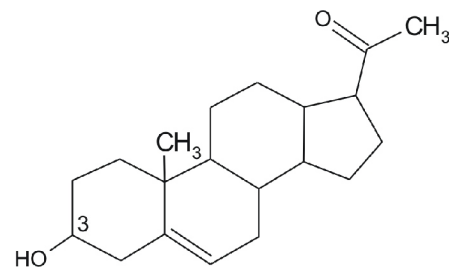
Sanguinarin



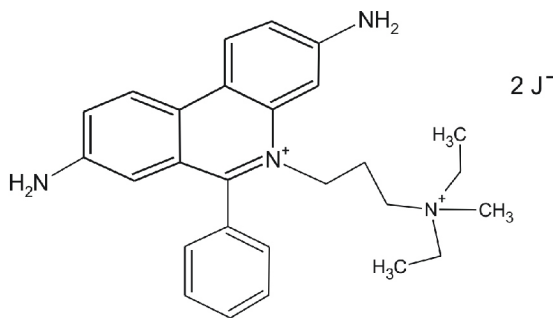
Hydrocortison (Cortisol)



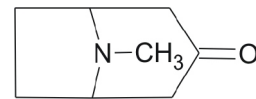
Ethidiumbromid



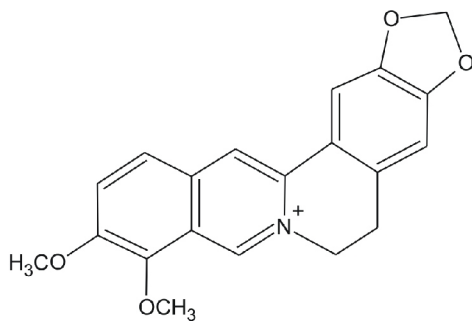
Pregnenolon



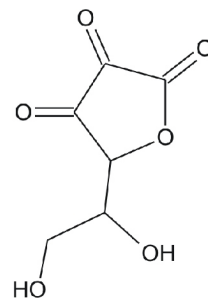
Propidiumjodid



Tropinon



Berberin



Dehydroascorbinsäure

**Abb. 31** Strukturanaloga der Benzophenanthridin-Alkaloide sowie ausgewählte Substrate der kurzkettingen Dehydrogenasen/Reduktasen

### 3.5.3.3 Ausgewählte Substrate der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen

Wie in Kap. 3.5.4 erläutert, ergaben Datenbankrecherchen mit Aminosäuresequenzen von zwei Fragmenten der isolierten Sanguinarin-Reduktase eine relativ hohe Sequenzhomologie mit einem Enzym aus der Klasse der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Diese Enzyme gehören zur Großfamilie der sogenannten kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen.

Um die Fähigkeit der Sanguinarin-Reduktase zur Umsetzung typischer Substrate von kurzkettigen Dehydrogenasen zu prüfen, wurden einige bekannte Vertreter, d. h. Hydrocortison, Pregnenolon, Tropinon sowie Dehydroascorbinsäure, getestet (Abb. 31). Keine dieser Verbindungen verursachte in Gegenwart des Enzyms einen Verbrauch an NADPH (Tab. 9). Daraus ergibt sich, daß das aus *Eschscholzia californica* isolierte Enzym eine sehr hohe Selektivität für die Benzophenanthridin-Strukturen des Sanguinarins und des Chelerythrins besitzt und keine bekannten Substrate der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen umsetzt. Ein Sanguinarin-reduzierendes Enzym mit dieser Spezifität ist aus der Literatur bisher nicht bekannt.

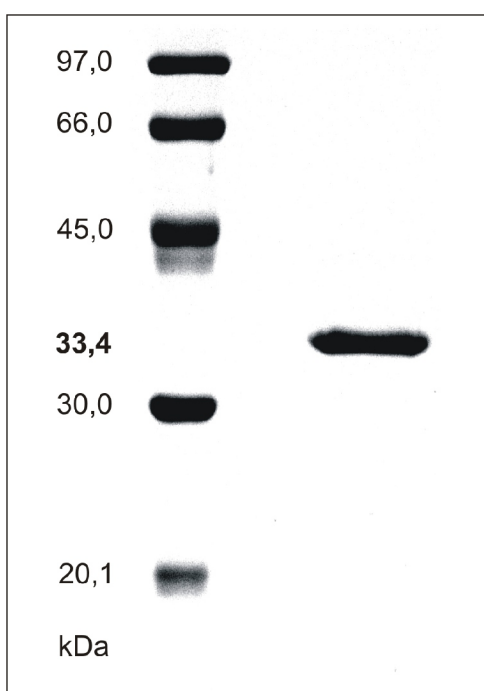
**Tab. 9** Substrat- und Reaktionsspezifität der Sanguinarin-Reduktase

Die Umsetzung ausgewählter Substrate durch das gereinigte Enzym (Fraktion 39 der Superdextrennung, s. Abb. 19; Proteingehalt: 2,64  $\mu$ g/ml) wurde durch die Bestimmung der NADPH-Konzentration (s. 2.12.3) sowie durch Fluoreszenzmessung\* (s. 2.12.1) verfolgt. Im Falle des DHS und des Pregnenolons wurde auf die Bildung von NADPH geprüft, welches bei einer Oxidation entstanden wäre.

Substrat (7 $\mu$ M)	Cosubstrat (20 $\mu$ M)	Bestimmung der NADPH-Konzentration durch INT/Diaphorase-Farbstest
Ethidiumbromid*	NADPH	<b>keine Umsetzung des NADPH</b> Eine Erhöhung der Proteinkonzentration auf 13 $\mu$ g/ml führte in Anwesenheit der angegebenen Substrate ebenfalls nicht zur Umsetzung von NADPH (vgl. Abb. 26B).
Propidiumjodid*		
Berberin*		
Hydrocortison		
Tropinon		
Dehydroascorbinsäure		
Dihydrosanguinarin*	NADP <sup>+</sup>	<b>keine Bildung von NADPH</b>
Pregnenolon		

### 3.5.4 Identifizierung des Sanguinarin-Reduktase-Proteins durch Teilsequenzierung und Massenspektrometrie

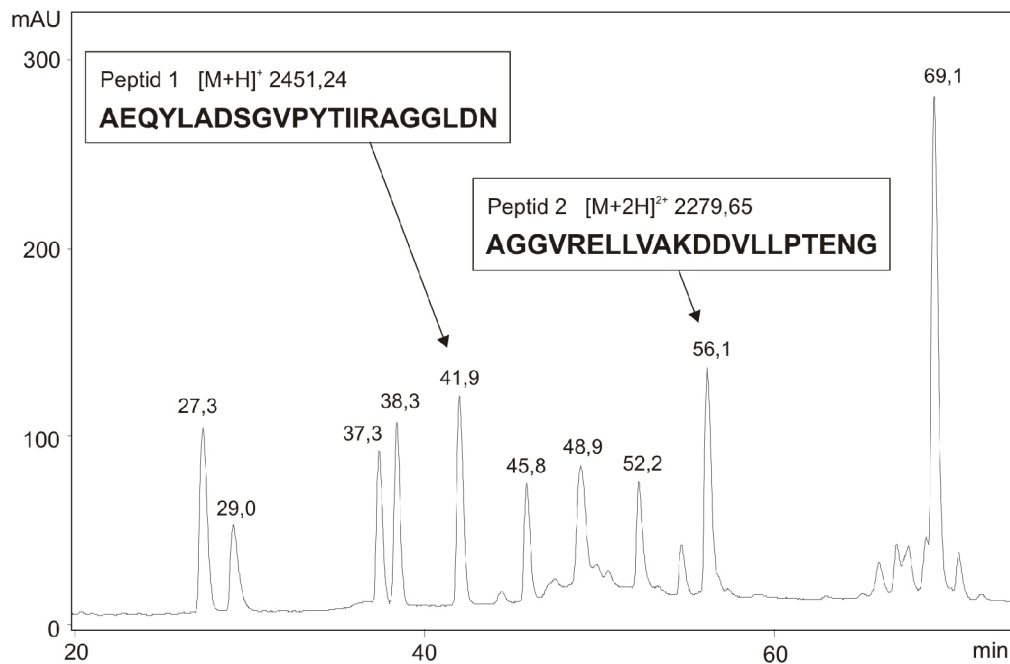
Zur Bestimmung der Aminosäuresequenz wurde das gereinigte Enzym (Fraktion 29 der Superose-Trennung, s. Abb. 21A) auf einem SDS-Gel getrennt (Abb. 32) und nach Elektroblothing auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran einem Edman-Abbau unterworfen. Da der N-Terminus blockiert war, wurde eine Spaltung des Proteins mit Trypsin durchgeführt; von den resultierenden Polypeptiden wurden zwei durch Edman-Abbau analysiert. Die in Abb. 33 dargestellten N-terminalen Aminosäuresequenzen wurden zur Datenbanksuche nach homologen Peptidsequenzen eingesetzt. Ein Protein gleicher Sequenz war in den NCBI-Datenbanken nicht auffindbar. Es wurde jedoch (neben ESTs und Proteinen unbekannter Funktion aus *Arabidopsis thaliana*) eine relativ hohe Sequenzhomologie (86 %) zu einer putativen 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Isomerase aus *Oryza sativa* gefunden (Abb. 34). Wie in Kap. 3.5.3.3 gezeigt wurde, unterscheidet sich das isolierte Enzym hinsichtlich der Substratspezifität jedoch erheblich von den bekannten Dehydrogenasen dieses Typs. Die Bestimmung der Molekülmasse des gereinigten Enzymproteins durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie lieferte einen Wert von 29 432 Da (vgl. 3.4.3). Weiterhin wurden 2 Cysteine außerhalb der analysierten Aminosäuresequenzen durch die spezifische Umsetzung des gereinigten Proteins mit Vinylpyridin nachgewiesen (Anstieg der Molekülmasse nach Derivatisierung um  $m/z$  210).



**Abb. 32** SDS-PAGE der gereinigten Sanguinarin-Reduktase

Linke Spur: Standardproteine  
Rechte Spur: 3  $\mu$ g Protein aus Fraktion 29 der Superose-Trennung (s. Abb. 21A)

Die Proteine wurden über ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 2.13) und mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. Nach dem Entfärben wurde das Gel mit einer Digitalkamera fotografiert.



**Abb. 33** HPLC-Trennung der Peptidbruchstücke nach Spaltung des Sanguinarin-Reduktase-Proteins mit Trypsin

Das gereinigte Protein (Fraktion 29 der Superose 12-Trennung, s. Abb. 21A) wurde nach Umsetzung mit DTE und Vinylpyridin durch Trypsin gespalten (s. 2.15). Nach Auftrennung des Polypeptidgemischs durch HPLC erfolgte die Bestimmung der Molekülmassen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Zwei Peptide (s. Abb.) wurden zur N-terminalen Sequenzierung nach Edman eingesetzt.

<b>Peptid 1</b> nach Trypsin-Verdau des aus <i>E. californica</i> isolierten Sanguinarin-Reduktase-Proteins	1	22	AEQYLADSGVPYTIIRAGGLDN
putative 3-beta-Hydroxysteroid- Dehydrogenase/Isomerase aus <i>Oryza sativa</i>	198	219	AEQYLADSGLPYTIIRAGGLQD
<b>Peptid 2</b> nach Trypsin-Verdau des aus <i>E. californica</i> isolierten Sanguinarin-Reduktase-Proteins	2	19	GGVRELLVAKDDVLLPTE
putative 3-beta-Hydroxysteroid- Dehydrogenase/Isomerase aus <i>Oryza sativa</i>	222	239	GGVRELLVGKDD EILKTE

**Abb. 34** Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen von zwei tryptischen Peptiden des Sanguinarin-Reduktase-Proteins mit Sequenzen der aus Reis bekannten putativen 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Isomerase

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Sanguinarin-Reduktase - ein neues Enzym des Benzophenanthridin-Metabolismus

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß in *Eschscholzia californica* ein Enzym mit hoher Selektivität für die Reduktion von Sanguinarin aktiv ist. Experimentelle Hinweise auf einen Abbau von Benzophenanthridinen in *Eschscholzia* wurden bereits berichtet, jedoch nur in Bezug auf das »Verschwinden« von Benzophenanthridinen (Sanguinarin, Chelerythrin und Macarpin) nach Erreichen eines Maximalgehaltes in einer elicierten Zellkultur von *Eschscholzia californica* [Villegas *et al.* 1999]. Collinge und Brodelius [1989] beobachteten in elicierten Suspensionskulturen von *E. californica* ebenfalls eine transiente Akkumulation von Sanguinarin und in stärkerem Maße von Chelerythrin; beide Alkaloide wurden danach innerhalb von 12 h weitgehend wieder metabolisiert. Die Autoren vermuten die Umsetzung beider Alkaloide zu Macarpin bzw. Chelilutin. Da für derartige Hydroxymethylierungen Enzyme nur auf der Stufe der Dihydroalkaloide gefunden wurden (s. 1.3.2, [De-Eknamkul *et al.* 1992, Kammerer *et al.* 1994]), würde dies eine zwischenzeitliche Reduktion von Sanguinarin und Chelerythrin erfordern.

Auch Pilzkulturen, z. B. das *Papaver*-spezifische Pathogen *Dendryphion penicillatum*, sind zur Metabolisierung von Sanguinarin in der Lage; die gebildeten Reaktionsprodukte sind jedoch nicht bekannt [Cline und Coscia 1988].

Die im Ergebnis der vorliegenden Arbeit aus Zellkulturen von *E. californica* isolierte Sanguinarin-Reduktase ist ein bisher unbekanntes Enzym im Stoffwechsel der Benzophenanthridine. Es handelt sich um ein lösliches 30 kDa-Protein, welches sehr wahrscheinlich im Cytosol lokalisiert ist. Dafür sprechen folgende Befunde:

- Nach Zellaufschluß und Fraktionierung wurde die Aktivität vollständig im 100 000 g-Überstand nachgewiesen. Dieser Überstand enthält die löslichen Enzyme des Cytosols und der meisten Organellen, u. a. vakuoläre Enzyme; in der Vakuole wäre die Sanguinarin-Reduktase jedoch auf Grund ihres pH-Optimums von 7,0 deutlich in ihrer Aktivität eingeschränkt (pH<sub>Vakuole</sub> 4,3 - 6,4 [Viehweger *et al.* 2002]).
- Das pH-Optimum der Reduktase von 7,0 erlaubt eine hohe Aktivität beim cytosolischen pH-Wert in *Eschscholzia*-Zellen (pH<sub>Cytosol</sub> 7,1 - 7,4 [Roos *et al.* 1998]).
- Während der Inkubation von Ganzzellen mit Sanguinarin taucht die charakteristische blaue Fluoreszenz des Dihydrosanguinarins zuerst und vorrangig im Cytoplasma auf (vgl. Abb. 11).



Das Enzym katalysiert die irreversible Reduktion des Sanguinarins mit NADPH als dem bevorzugten Elektronendonator.

Es zeigt eine ausgeprägte Selektivität für Sanguinarin (vgl. Abb. 27D). Im Gegensatz dazu weist die Sanguinarin-produzierende Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (EC 1.5.3.12) nur geringe Spezifitätsunterschiede zwischen ihren Substraten, den Dihydroalkaloiden, auf [Schumacher und Zenk 1988, Arakawa *et al.* 1992].

Obwohl die analysierten Aminosäuresequenzen aus dem Sanguinarin-Reduktase-Protein Ähnlichkeiten mit Sequenzen von  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen/Isomerasen zeigen, werden typische Substrate dieser weit verbreiteten Enzymklasse nicht umgesetzt (s. 3.5.3.3, Tab. 9).  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen gehören zur Gruppe der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) [Kallberg *et al.* 2002]. Während diese Enzyme Ketogruppen an einer Vielzahl von Ringsystemen reduzieren (3-Ketogruppe der Steroide [Ohno *et al.* 1991], Ketogruppe des Tropinons [Nakajima *et al.* 1993] und der Dehydroascorbinsäure [Del Bello *et al.* 1994]), benötigt die Sanguinarin-Reduktase als Substratstruktur mindestens einen quarternären Stickstoff, der über eine Doppelbindung mit dem benachbarten C-Atom verbunden ist. Daneben erkennt das Enzym offenbar wesentliche Elemente des Benzophenanthridin-Grundgerüsts, was sich in der hohen Spezifität für Sanguinarin gegenüber hydroxylierten bzw. methoxysubstituierten Alkaloiden (10-Hydroxychelerythrin, Chelirubin und Macarpin) zeigt (vgl. Abb. 27D). Die Sequenzähnlichkeit des Enzymproteins mit den  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen/Isomerasen liefert also keinen Hinweis auf die unterschiedliche Substratspezifität und damit auf die biologische Funktion der Sanguinarin-Reduktase.

Auch Protoberberine, z. B. Berberin, gehören nicht zu den Substraten der Sanguinarin-Reduktase (vgl. Tab. 9). Diese Alkaloide unterscheiden sich von den Benzophenanthridinen u. a. dadurch, daß der quarternäre Stickstoff in zwei Ringsysteme einbezogen wird (vgl. Abb. 31). Im Stoffwechsel der Protoberberine ist dagegen eine andere, spezifische Reduktase-Aktivität bekannt: Die Berberin-Reduktase (EC 1.5.1.31) katalysiert reversibel die Umwandlung von Protoberberinen zu (R)-Tetrahydroderivaten, wobei intermediär 7,8-Dihydroprotoberberine entstehen (vgl. Abb. 30, [Bauer und Zenk 1991]). Diese Reaktion ist ebenfalls NADPH-abhängig. Das Zusammenspiel von Tetrahydroberberin-Oxidase (STOX, EC 1.3.3.8; [Amann *et al.* 1988, Okada *et al.* 1988]) und Berberin-Reduktase ermöglicht die Umwandlung von (S)-Tetrahydroprotoberberinen, z. B. (S)-Canadin, in die entsprechenden (R)-Enantiomere (vgl. Abb. 3). Die Berberin-Reduktase wurde jedoch bisher nicht gereinigt oder detaillierter charakterisiert.

Synthetische Phenanthridin-Analoga, z. B. Ethidiumbromid und Propidiumjodid, werden von der Sanguinarin-Reduktase nicht umgesetzt (vgl. Tab. 9).

## 4.2 Die zelluläre Funktion der Sanguinarin-Reduktase

### 4.2.1 Kopplung von Aufnahme und Reduktion

In der intakten, zur Alkaloidproduktion befähigten Zelle wurde die Reduktion von Benzophenanthridinen bisher nur im Zusammenhang mit deren Aufnahme nach externem Zusatz nachgewiesen.

Die Aufnahme der untersuchten Benzophenanthridine zeigt hinsichtlich ihrer Spezifität eine enge Verwandtschaft zur Substratspezifität der Sanguinarin-Reduktase (vgl. Abb. 27A+D), d. h. neben Sanguinarin wird Chelerythrin mit deutlich geringerer Rate umgesetzt, während die Reduktion der übrigen Benzophenanthridine nur bei sehr hohen Enzymkonzentrationen nachweisbar ist (vgl. Abb. 26B). Dieselbe Bevorzugung ist bei der Reduktion des Sanguinarins in der > 30 kDa-Proteinfraction nachweisbar (vgl. Abb. 27C). Eine Ausnahme bildet lediglich der 100 000 g-Überstand (vgl. Abb. 27B), in dem sich neben den löslichen Proteinen auch die niedermolekularen Bestandteile der Zellen und des Aufarbeitungspuffers auf die Umsetzung auswirken können. In dieser Fraktion werden die Alkaloidmischung höher substituierter Benzophenanthridine sowie Chelerythrin mit etwa gleicher Rate wie Sanguinarin reduziert. Vorversuche lassen vermuten, daß DTE für die veränderte Spezifität verantwortlich ist, wobei sowohl eine Interaktion mit den Benzophenanthridinen (Sanguinarin-*Glutathion*-Konjugate sind bekannt, jedoch bisher nicht isoliert, s. 1.3.3.1) als auch mit dem Enzymprotein (2 Cysteine enthaltend, s. 3.5.4) vorstellbar ist.

Auf dem Niveau der Ganzzelle ist die Reduktion der Benzophenanthridine sehr eng mit ihrer Aufnahme gekoppelt. Dies geht aus folgenden Befunden hervor:

- Der Verlust zugesetzter Benzophenanthridine aus dem Medium korreliert für alle eingesetzten Alkaloide mit dem Auftreten der entsprechenden Dihydroalkaloide bzw. ihrer Metabolisierungsprodukte in den Zellen (vgl. Abb. 14A).
- Das Auftreten von Dihydroalkaloiden im Außenmedium wurde in keinem Fall beobachtet.
- Die Spezifität der durch das gereinigte Enzym katalysierten Umsetzung entspricht der Spezifität der Aufnahme externer Benzophenanthridine (s.o.).
- Nicht reduzierbare Alkaloide, z. B. das strukturähnliche Berberin, sowie die Phenanthridin-Analoga Ethidiumbromid und Propidiumjodid werden von intakten Zellen nicht aufgenommen; Propidiumjodid kann umgekehrt zur Kontrolle der Permeabilität der Zellmembran eingesetzt werden [Viehweger *et al.* 2002].
- Die experimentell im Zellpellet meßbaren, z. B. nach Elicitoreinwirkung gebildeten Alkaloide sind nicht im Cytoplasma oder cytoplasmatischen Organellen, sondern in der Zellwand lokalisiert [Färber *et al.* 2003].

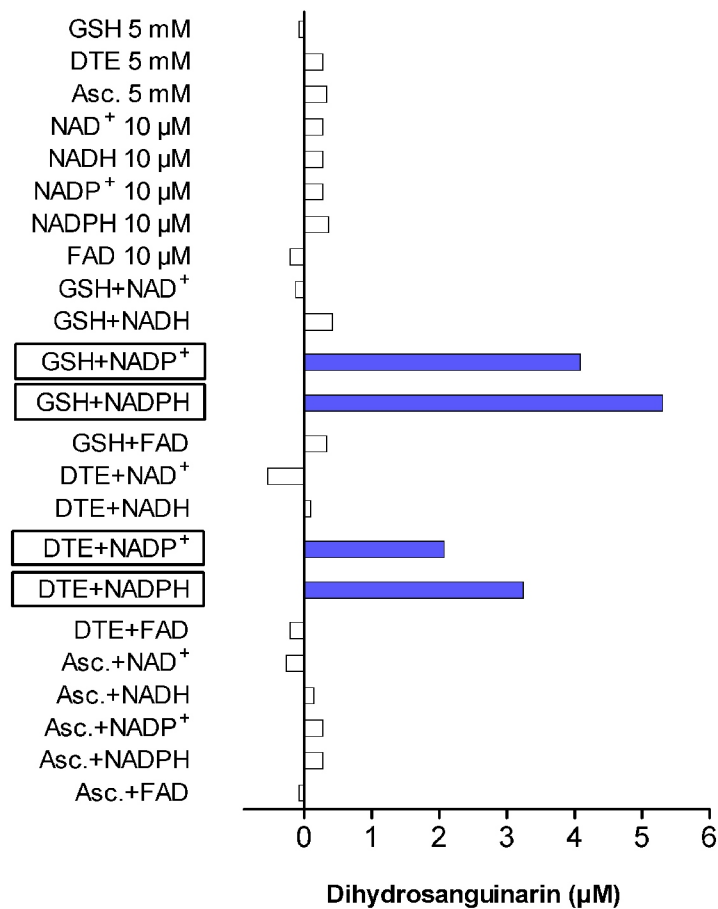
Wie aus der in Abb. 24 gezeigten Substrathemmung der Sanguinarin-Reduktase hervorgeht, würde eine Anhäufung von mehr als 7  $\mu\text{M}$  Sanguinarin zu einem drastischen Abfall der Umsatzrate und damit auch der Aufnahme führen. Eine solche Verringerung der Metabolisierungsrate wurde jedoch nicht festgestellt (vgl. Abb. 10).

Da *in den Zellen* kaum Benzophenanthridine nachweisbar sind, sollte bei externem Zusatz ein nach innen gerichteter Konzentrationsgradient aufgebaut werden (vgl. Abb. 14A). Bei Annahme einer unspezifischen Aufnahme der Alkaloide müßten zunächst alle in etwa gleicher Konzentration im Cytoplasma erscheinen, dort würde jedoch nur Sanguinarin (und in geringerem Maße Chelerythrin) reduziert. Die nicht oder nur langsam reduzierbaren Benzophenanthridine müßten dann zumindest transient in der Zelle nachweisbar sein, was experimentell jedoch nicht gefunden wurde. Es ist daher anzunehmen, daß die Aufnahme der Benzophenanthridine durch die Plasmamembran und die intrazelluläre Reduktion etwa dieselbe Spezifität besitzen, worauf auch die oben genannten Ergebnisse hinweisen.

Wie schon erwähnt, ist die Sanguinarin-Reduktase ein lösliches, cytosolisches Enzym, d. h. ohne feste Bindung an die Plasmamembran (was aber eine nichtkovalente Interaktion mit der Membranoberfläche nicht ausschließt). Es sollte deshalb eine Komponente der Plasmamembran existieren, welche die aufgenommenen Alkaloide unmittelbar an die (gegebenenfalls membranassoziierte) Sanguinarin-Reduktase übergibt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sprechen deshalb für ein Transportsystem, welches eine deutlich geringere Aktivität besitzt als die Reduktase-Reaktion oder den Kontakt mit der Reduktase zur Aufrechterhaltung seiner Aktivität benötigt.

#### **4.2.2 Wechselspiel zwischen Sanguinarin-Reduktase und Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase**

Wie in Kap. 1.3.2 erläutert, werden die im Verlauf der Alkaloidbiosynthese gebildeten Dihydrobenzophenanthridine durch das Enzym Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase in die Benzophenanthridine überführt [Schumacher und Zenk 1988, Arakawa *et al.* 1992]. Sowohl die Sanguinarin-Reduktase als auch die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase sind lösliche, cytoplasmatische Enzyme und sowohl im 100 000 g-Überstand als auch in den Überständen der Ultrafiltration ( $> 10$  kDa) gemeinsam anwesend. Man sollte deshalb erwarten, daß die in diesen Fraktionen durch die Sanguinarin-Reduktase gebildeten Dihydroalkaloide durch die Oxidase wieder zu den Benzophenanthridinen oxidiert werden können. Dies ist offenbar der Fall, wie folgende Experimente zeigen: In der  $> 10$  kDa-Fraktion kann nach Zusatz von Sanguinarin und NADPH keine Reduktion nachgewiesen werden (Abb. 35). Wird dagegen zusätzlich GSH oder DTE zugesetzt, kommt es zur Bildung von Dihydrosanguinarin.



**Abb. 35** Test verschiedener Elektronendonatoren auf Reduktion von Sanguinarin in der > 10 kDa-Proteinfraktion

Die durch Ultrafiltration des 100 000 g-Überstandes erhaltene > 10 kDa-Proteinfraktion wurde mit verschiedenen Elektronendonatoren sowie 7 µM Sanguinarin inkubiert (s. 2.10.2); Asc. - Ascorbinsäure. Die Quantifizierung des gebildeten Dihydroanguinarins erfolgte durch Fluoreszenzmessung (s. 2.12.1).

Dieses Ergebnis läßt sich plausibel erklären, wenn man davon ausgeht, daß das durch die Sanguinarin-Reduktase gebildete Dihydroalkaloid durch die gleichzeitig anwesende Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase wieder zu Sanguinarin oxidiert wird. Die Aktivität der Oxidase wird durch Glutathion deutlich gehemmt (s. 3.4.1, [Arakawa *et al.* 1992]). In den GSH- bzw. DTE-enthaltenden Proteinextrakten sollte deshalb die Reduktase-Aktivität die Oxidase-Aktivität überwiegen, so daß eine Bildung der Dihydroalkaloide nachweisbar wird. Dies impliziert zugleich, daß in der intakten Zelle die Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase vom Glutathion-Spiegel abhängig ist.

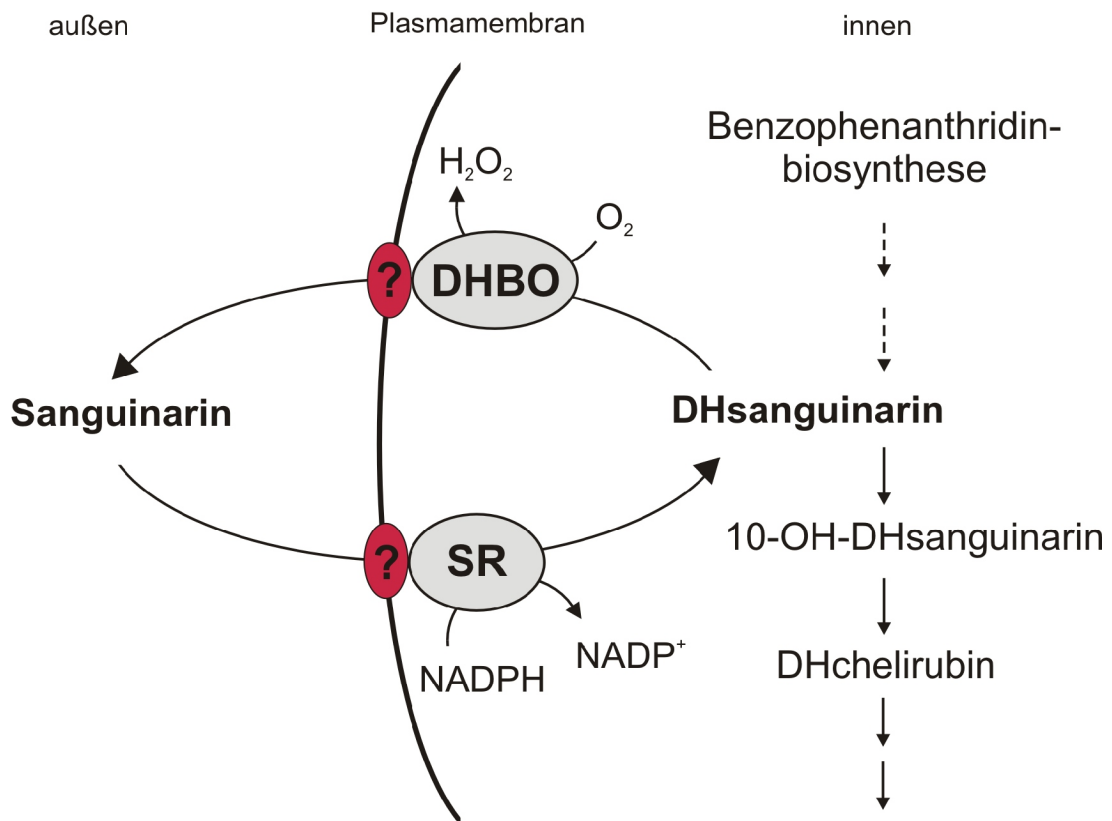
Interessanterweise erfolgt in Gegenwart von GSH die Reduktion von Sanguinarin sowohl mit NADPH als auch NADP<sup>+</sup>. Da eine direkte Übertragung von Elektronen vom GSSG/2GSH-System auf das NADP<sup>+</sup>/NADPH-System thermodynamisch nicht möglich ist [Schafer und Buettner 2001], muß man annehmen, daß NADP<sup>+</sup>-reduzierende Verbindungen im Extrakt anwesend sind.

#### 4.2.3 Turnover von Sanguinarin

Da Dihydrosanguinarin, nicht aber Sanguinarin, ein essentielles Zwischenprodukt für die Biosynthese höher substituierter Benzophenanthridine ist (vgl. Abb. 2 und 3), stellt sich die Frage, ob in der verwendeten Zellkultur Sanguinarin bei der gewählten Zelldichte und niedrigen Elicitorkonzentration wirklich gebildet wird. Folgende Fakten befürworten jedoch die Bildung von Sanguinarin:

- Der Gehalt an Dihydrosanguinarin steigt nach Elicitierung der Zellsuspension deutlich an (vgl. Abb. 7A).
- Die für die Oxidation des Dihydrosanguinarins zu Sanguinarin verantwortliche Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase ist in den Zellen vorhanden, wie der Aktivitätsnachweis nach Abtrennung von der Sanguinarin-Reduktase zeigt (vgl. Abb. 18). Das Enzym ist in Gegenwart von 5 mM GSH zwar gehemmt, zeigt aber eine substantielle Restaktivität (s. 3.4.1).
- Sanguinarin wurde unter den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bedingungen weder in nichtstimulierten noch in elicitierten Suspensionen nachgewiesen, wohl aber in Suspensionen nach längerer Behandlung mit hohen Elicitorkonzentrationen (> 50 µg/ml). Diese Suspensionen enthalten eine hohe Anzahl an toten Zellen, was durch die Bindung von Alkaloiden an die Kernregionen oder durch Permeabilitätstests leicht nachweisbar ist. Das Auftreten von Sanguinarin in geschädigten Zellen ist gut mit der in Abb. 36 vorgestellten Arbeitshypothese vereinbar, da die Reduktion des Sanguinarins Stoffwechselaktivität in Form eines ausreichend hohen NADPH-Spiegels erfordert.

Eine Trennung des im Biosyntheseverlauf gebildeten Dihydrosanguinarins von dem durch Aufnahme und Reduktion von externem Alkaloid gebildeten Dihydrosanguinarins durch Kompartimentierung ist zwar nicht völlig auszuschließen, erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, da das von außen zugesetzte Sanguinarin nach seiner Umwandlung zu Dihydrosanguinarin offensichtlich die Biosyntheseorte der nachfolgenden Benzophenanthridine erreicht. Dies wird durch den Anstieg von 10-Hydroxydihydrosanguinarin und Dihydrochelirubin nahegelegt (vgl. Abb. 12A und 15).



**Abb. 36** Zusammenspiel von Sanguinarin-Ausscheidung und Wiederaufnahme in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*

Das im Verlauf der Biosynthese gebildete Dihydro-sanguinarin wird durch die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (DHBO) oxidiert und ausgeschieden. Externes Sanguinarin wird durch die Zellen von *E. californica* aufgenommen und durch die Sanguinarin-Reduktase (SR) in inaktives Dihydro-sanguinarin umgewandelt. Dieses wird, der Biosynthese entsprechend, weiter metabolisiert. Dieser Mechanismus garantiert die Einstellung einer Gleichgewichtskonzentration und verhindert damit die Akkumulation des Toxins Sanguinarin.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß mehrere Gründe für die intermediäre Bildung von Sanguinarin sprechen, auch wenn dieses unter den oben genannten Bedingungen in der intakten Kultur nicht nachweisbar ist.

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung aller relevanten Daten erscheint deshalb folgende Vorstellung über die Dynamik der Bildung und Umwandlung von Sanguinarin und Dihydro-sanguinarin realistisch (Abb. 36):

1. **Das im Biosyntheseverlauf gebildete Dihydrosanguinarin wird unmittelbar vor oder während seiner Ausscheidung in die Zellwand zu Sanguinarin oxidiert.**

Alle im Zellpellet gefundenen Benzophenanthridine sind wahrscheinlich zellwandgebunden [Färber *et al.* 2003, Viehweger 2003]. Innerhalb intakter Zellen konnte mit konfokaler Mikroskopie die charakteristische Fluoreszenz der Benzophenanthridine nicht nachgewiesen werden.

2. **Das im Apoplasten erscheinende Sanguinarin wird anschließend rasch von den Zellen aufgenommen. Dieser Schritt ist eng mit seiner Reduktion zu Dihydro-sanguinarin verbunden.**

Auf Grund der fehlenden positiven Ladung ist die Toxizität des Dihydrosanguinarins stark vermindert, so daß eine gewisse Akkumulation toleriert werden kann.

3. **Das in den Zellen auftauchende Dihydrosanguinarin wird weiter metabolisiert (hydroxyliert und methyliert).**

Die entsprechenden Dihydroalkaloide stehen vermutlich für die Bildung der im Biosyntheseverlauf folgenden Benzophenanthridine zur Verfügung.

Nach dieser Vorstellung kann Sanguinarin deshalb nicht im Außenmedium gefunden werden, weil seine Ausscheidung langsamer ist als die Wiederaufnahme. Dies ist tatsächlich nachweisbar: Einer Exkretion von maximal 4  $\mu\text{M}$  Benzophenanthridinen pro 24 h (vgl. Abb. 8) steht die Fähigkeit zur Aufnahme von 13  $\mu\text{M}$  Sanguinarin innerhalb von 120 min gegenüber (vgl. Tab. 7, Abb. 12A). Da Sanguinarin bereits im mikromolaren Bereich seine toxischen Wirkungen entfaltet (s. 1.3.3), ist anzunehmen, daß sehr geringe steady-state-Konzentrationen, die sich aus dem oben genannten Mechanismus ergeben, ausreichend wirksam sind.

---

Der vorgeschlagene Ausscheidungs/Wiederaufnahme-Mechanismus bringt für die produzierenden Zellen Vorteile beim Umgang mit Sanguinarin:

- Infolge der Kopplung von Oxidation und Ausscheidung akkumuliert das toxische Sanguinarin nicht im Cytosol, sondern außerhalb der Plasmamembran. Dort steht es als Phytoalexin für die Abwehr potentieller Pathogene zur Verfügung.
- Durch die enge Kopplung von Wiederaufnahme und Reduktion werden Schäden an der Plasmamembran durch eine ungebremste extrazelluläre Akkumulation des Toxins verhindert; gleichzeitig wird dessen intrazelluläre Anhäufung unterbunden. Das gebildete Dihydrosanguinarin steht dennoch für weitere Biosynthese-Schritte zur Verfügung.

Daß die Reduktion und damit die Entgiftung an intakte Zellen gebunden ist, zeigt ein einfaches Experiment: Wird die Plasmamembran durch osmotische Behandlung oder Detergenzien permeabilisiert, so ist sofort die Fluoreszenz der Benzophenanthridine in der Zelle nachweisbar, insbesondere ihre Akkumulation an der DNA.

Die oben genannte Arbeitshypothese bietet deshalb eine plausible Erklärung für den Umgang der *Eschscholzia*-Zellen mit einem sehr wirksamen Toxin.



## 5 Ausblick auf weiterführende Experimente

Im Ergebnis der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell zur Aufnahme, Reduktion und nachfolgenden Metabolisierung externer Benzophenanthridine, insbesondere Sanguinarin, in Zellen von *Eschscholzia californica* vorgestellt. Diese aus HPLC/MS-Analysen abgeleitete Arbeitshypothese sollte durch den Einsatz von radioaktiv markiertem Sanguinarin und Chelerythrin verifiziert werden.

Die aus Zellkulturen gereinigte, lösliche Sanguinarin-Reduktase katalysiert *in vitro* die Reduktion von Sanguinarin durch NADPH. Erste Versuche zeigen, daß Sanguinarin mit Glutathion, welches in millimolaren Konzentrationen im Cytosol vorliegt, interagiert. Das gebildete Reaktionsprodukt, welches bisher nicht identifiziert werden konnte, wird durch die Sanguinarin-Reduktase in Anwesenheit von NADPH ebenfalls zu Dihydrosanguinarin umgesetzt. Daraus ergibt sich die Frage nach dem eigentlichen zellulären Substrat des Enzyms.

Die Spezifität von Aufnahme und enzymatischer Reduktion der Alkaloide läßt die Beteiligung eines Transportsystems vermuten, dessen Identifizierung und Charakterisierung ebenfalls Zielstellung anschließender Arbeiten sein sollte. Die potentielle Kopplung von Transport und Reduktion des Sanguinarins könnte durch folgende Versuchseinstellungen weiter aufgeklärt werden:

- Die Herstellung und Anwendung von substituierten Sanguinarin-Derivaten ermöglicht sowohl Aussagen zur Spezifität als auch Inhibitorstudien zur Aufnahme und Reduktion von Sanguinarin.
- Experimente mit potentiellen Hemmstoffen von ABC-Transportern würden erste Anhaltspunkte für die mögliche Beteiligung eines solchen Transportsystems liefern, wie es in *Coptis japonica* für die Aufnahme von Berberin beschrieben wurde [Sakai *et al.* 2002].
- Anhand der Teilsequenzen des Sanguinarin-Reduktase-Proteins lassen sich entsprechende Oligonucleotide synthetisieren, die als Sonde zur Isolierung der cDNA genutzt werden können. Die nachfolgende Transformation (antisense) von *Eschscholzia californica* sollte zu Zellsuspensionen führen, welche nicht in der Lage sind, Sanguinarin zu reduzieren. Mit Hilfe dieser Transformanten ließen sich folgende Fragen zur Kopplung von Aufnahme und Reduktion des Sanguinarins beantworten:
  1. Ist die Aufnahme von Sanguinarin auch ohne die Aktivität der Reduktase möglich?
  2. Läßt sich in den Transformanten die Elicitor-induzierte Bildung von Sanguinarin nachweisen?

## 6 Zusammenfassung

1. Zellsuspensionskulturen von *Eschscholzia californica* produzieren Benzophenanthridine, deren Bildungsrate nach Zusatz eines Glycoprotein-Elicitors aus Bäckerhefe deutlich erhöht werden kann. Diese Alkaloide werden praktisch vollständig ins Außenmedium abgegeben, sie sind auch in der Zellwand nachweisbar.
2. Extern zugesetzte Benzophenanthridine werden von den Zellen aufgenommen, wobei Sanguinarin die weitaus höchste Aufnahmerate zeigt ( $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g TM}^{-1}$ ).
3. Die Aufnahme ist eng mit der Reduktion der Alkaloide gekoppelt, so daß in den Zellen ausschließlich die gebildeten Dihydroalkaloide nachweisbar sind. Das nach Aufnahme von Sanguinarin gebildete Dihydrosanguinarin erreicht sehr wahrscheinlich die intrazellulären Biosyntheseorte und wird dort weiter substituiert.
4. Aus einem durch Zellaufschluß erhaltenen 15 000 g-Überstand wurde mit Hilfe eines 5-stufigen FPLC-Trennungsgangs ein lösliches 30 kDa-Protein isoliert und gereinigt. Das bisher unbekannte Enzym Sanguinarin:NADPH-Oxidoreduktase katalysiert die irreversible Reduktion von Sanguinarin mit NADPH zu Dihydrosanguinarin. Diese Sanguinarin-Reduktase zeigt eine ähnliche Selektivität für Sanguinarin wie die Aufnahme durch intakte Zellen. Deutlich geringer sind die Umsatzraten für Chelerythrin (68 %;  $0,13 \text{ U}\cdot\text{mg Protein}^{-1}$ ) oder höher substituierte Benzophenanthridine (3 %;  $6 \text{ mU}\cdot\text{mg Protein}^{-1}$ ). Weder synthetische Phenanthridine (Ethidiumbromid und Propidiumjodid) noch strukturähnliche Alkaloide vom Berberintyp werden reduziert. Die in der  $> 30 \text{ kDa}$ -Proteinfraktion ebenfalls nachweisbare Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase konnte im Verlauf der Reinigung vollständig von der Sanguinarin-Reduktase abgetrennt werden.
5. Nach Trypsinverdau wurden aus dem Sanguinarin-Reduktase-Protein mehrere Peptidbruchstücke isoliert, von denen zwei nach Edman ansequenziert wurden (ca. 20 Aminosäuren) und u. a. eine erkennbare Sequenzhomologie mit einer  $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Isomerase aus *Oryza sativa* aufweisen.

---

Typische Substrate dieser Enzyme aus der Großfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen werden durch die Sanguinarin-Reduktase jedoch nicht umgesetzt. Die essentielle Substratstruktur des Enzyms erfordert einen methylierten quarternären Stickstoff im heteroaromatischen Ringsystem der Benzophenanthridine.

6. Obwohl Sanguinarin, das bevorzugte Substrat der Sanguinarin-Reduktase, in der verwendeten Zellkultur nicht oder nur unter besonderen Bedingungen nachweisbar ist, kann man davon ausgehen, daß dieses Alkaloid stetig gebildet, in die Zellwand ausgeschieden, anschließend aufgenommen und durch die Sanguinarin-Reduktase reduziert wird. Sehr wahrscheinlich wird durch die Aktivitäten der löslichen Enzyme Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase und Sanguinarin-Reduktase, jeweils gekoppelt mit einem Ausscheidungs- bzw. Aufnahmeschritt, eine steady-state-Konzentration von externem Sanguinarin aufrechterhalten, die für dessen antimikrobielle Wirkung ausreichend ist. Es ist deshalb ein Ausscheidungs- und Wiederaufnahme-Mechanismus für Sanguinarin anzunehmen, welcher die Benutzung dieses Alkaloids als Phytoalexin erlaubt und gleichzeitig die Zelle vor diesem Toxin schützt.
  
7. Insbesondere die enge Kopplung der Sanguinarin-Reduktase-Reaktion mit der Aufnahme externer Alkaloide spricht für ein mit diesem Enzym assoziiertes Transportsystem, dessen Charakterisierung weiteren Arbeiten vorbehalten ist.

---

## 7 Literaturverzeichnis

**Amann, M.; Wanner, G.; Zenk, M.H.** (1986) Intracellular compartmentation of two enzymes of berberine biosynthesis in plant cell cultures. *Planta* 167, 310-320

**Amann, M.; Nagakura, N.; Zenk, M.H.** (1988) Purification and properties of (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase from suspension-cultured cells of *Berberis wilsoniae*. *Eur. J. Biochem.* 175, 17-25

**Arakawa, H.; Clark, W.G.; Psenak, M.; Coscia, C.J.** (1992) Purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from elicited *Sanguinaria canadensis* cell cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 1-7

**Ashihara, H.; Monteiro, A.M.; Moritz, T.; Gillies, F.M.; Crozier, A.** (1996) Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of *Coffea arabica* L. *Planta* 198, 334-339

**Ashihara, H.; Gillies, F.M.; Crozier, A.** (1997) Metabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Cell Physiol.* 38, 413-419

**Babich, H.; Zuckerbraun, H.L.; Barber, I.B.; Babich, S.B.; Borenfreund, E.** (1996) Cytotoxicity of sanguinarine chloride to cultured human cells from oral tissue. *Pharmacol. Toxicol.* 78, 397-403

**Bajaj, N.P.S.; McLean, M.J.; Waring, M.J.; Smekal, E.** (1990) Sequence-selective, pH-dependent binding to DNA of benzophenanthridine alkaloids. *J. Mol. Recognit.* 3, 48-54

**Bauer, W. und Zenk, M.H.** (1991) Formation of (R)-configured tetrahydroprotoberberine alkaloids *in vivo* and *in vitro*. *Tetrahedron Lett.* 32, 487-490

**Baur, P.S. und Walkinshaw, C.H.** (1974) Fine structure of tannin accumulations in callus of *Pinus elliotti* (slash pine). *Can. J. Bot.* 52, 615-619

**Berlin, J.; Forche, E.; Wray, V.; Hammer, J.; Hösel, W.** (1983) Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Z. Naturforsch.* 38c, 346-352

**Bilski, P.; Li, M.Y.; Ehrenshaft, M.; Daub, M.E.; Chignell, C.F.** (2000) Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem. Photobiol.* 71, 129-134

- Bird, D.A. und Facchini, P.J.** (2001) Berberine bridge enzyme, a key branch-point enzyme in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis, contains a vacuolar sorting determinant. *Planta* 213, 888-897
- Blechert, S.; Brodschelm, W.; Hölder, S.; Kammerer, L.; Kutschan, T.M.; Mueller, M.J.; Xia, Z.-Q.; Zenk, M.H.** (1995) The octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4099-4105
- Bock, A.; Wanner, G.; Zenk, M.H.** (2002) Immunocytological localization of two enzymes involved in berberine biosynthesis. *Planta* 216, 57-63
- Boehringer Mannheim** (1989) D-Sorbit/Xylit. Farb-Test zur Bestimmung von D-Sorbit oder Xylit in Lebensmitteln und anderen Probematerialien. In: Methoden der biochemischen Analytik und Lebensmittelanalytik. Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, 130-132
- Boulware, R. und Schlowsky, G.** (1990) Production of high purity alkaloids. Eur. Pat. Appl., Patent No. EP 0 379 623 A1
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brown, R.M.; Franke, W.W.; Kleinig, H.; Falk, H.; Sitte, P.** (1970) Scale formation in chrysophycean algae: I. Cellulosic and noncellulosic wall components made by the Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* 45, 246-271
- Byun, S.Y. und Pedersen, H.** (1991) Elicitation and *in situ* recovery of alkaloids in suspension cultures of californian poppy. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1, 220-226
- Callahan, T.M.; Rose, M.S.; Meade, M.J.; Ehrenshaft, M.; Upchurch, R.G.** (1999) CFP, the putative cercosporin transporter of *Cercospora kikuchii*, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 901-910
- Cavallini, L.; Bindoli, A.; Macri, F.; Vianello, A.** (1979) Lipid peroxidation induced by cercosporin as a possible determinant of its toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 28, 139-146
- Chaturvedi, M.M.; Kumar, A.; Darnay, B.G.; Chainy, G.B.N.; Agarwal, S.; Aggarwal, B.B.** (1997) Sanguinarine (pseudocheletrythrine) is a potent inhibitor of NF- $\kappa$ B activation, I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, and degradation. *J. Biol. Chem.* 272, 30129-30134

**Chung, K.-R.; Jenns, A.E.; Ehrenshaft, M.; Daub, M.E.** (1999) A novel gene required for cercosporin toxin resistance in the fungus *Cercospora nicotianae*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 382-389

**Chung, K.-R.; Daub, M.E.; Kuchler, K.; Schüller, C.** (2003) The *CRG1* gene required for resistance to the singlet oxygen-generating cercosporin toxin in *Cercospora nicotianae* encodes a putative fungal transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 302-310

**Clark, C.** (2000) The genus *Eschscholzia*. California poppies and their relatives. Taxonomic history of *Eschscholzia*. <http://www.csupomona.edu/~jcclark/poppy/history.html>

**Cline, S.D. und Coscia, C.J.** (1988) Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiol.* 86, 161-165

**Cline, S.D.; McHale, R.J.; Coscia, C.J.** (1993) Differential enhancement of benzophenanthridine alkaloid content in cell suspension cultures of *Sanguinaria canadensis* under conditions of combined hormonal deprivation and fungal elicitation. *J. Nat. Prod.* 56, 1219-1228

**Collinge, M.A. und Brodelius, P.E.** (1989) Dynamics of benzophenanthridine alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica* after treatment with a yeast elicitor. *Phytochemistry* 28, 1101-1104

**Cowan, M.M.** (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564-582

**Daub, M.E.** (1982) Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology* 72, 370-374

**Daub, M.E.** (1987) Resistance of fungi to the photosensitizing toxin, cercosporin. *Phytopathology* 77, 1515-1520

**Daub, M.E.; Leisman, G.B.; Clark, R.A.; Bowden, E.F.** (1992) Reductive detoxification as a mechanism of fungal resistance to singlet oxygen-generating photosensitizers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9588-9592

**Daub, M.E. und Ehrenshaft, M.** (2000) The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 461-490

- Daub, M.E.; Li, M.; Bilski, P.; Chignell, C.F.** (2000) Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: a possible defense against cercosporin phototoxicity in *Cercospora*. *Photochem. Photobiol.* 71, 135-140
- Debiton, E.; Madelmont, J.-C.; Legault, J.; Barthomeuf, C.** (2003) Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51, 474-482
- Decker, G.; Wanner, G.; Zenk, M.H.; Lottspeich, F.** (2000) Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis* 21, 3500-3516
- De-Eknamkul, W.; Tanahashi, T.; Zenk, M.H.** (1992) Enzymic 10-hydroxylation and 10-*O*-methylation of dihydrosanguinarine in dihydrochelirubine formation by *Eschscholtzia*. *Phytochemistry* 31, 2713-2717
- Del Bello, B.; Maellaro, E.; Sugherini, L.; Santucci, A.; Comporti, M.; Casini, A.F.** (1994) Purification of NADPH-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver and its identification with 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. J.* 304, 385-390
- Deus-Neumann, B. und Zenk, M.H.** (1984) A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta* 162, 250-260
- Deus-Neumann, B. und Zenk, M.H.** (1986) Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism. *Planta* 167, 44-53
- Dorman, H.J.D. und Deans, S.G.** (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316
- Dzink, J.L. und Socransky, S.S.** (1985) Comparative *in vitro* activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 663-665
- Ehrenshaft, M.; Jenness, A.E.; Chung, K.R.; Daub, M.E.** (1998) *SOR1*, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms. *Mol. Cell* 1, 603-609
- Ehrenshaft, M.; Bilski, P.; Li, M.Y.; Chignell, C.F.; Daub, M.E.** (1999) A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9374-9378

- Ehrenshaft, M. und Daub, M.E.** (2001) Isolation of *PDX2*, a second novel gene in the pyridoxine biosynthesis pathway of eukaryotes, archaeobacteria, and a subset of eubacteria. *J. Bacteriol.* 183, 3383-3390
- Eisner, T. und Meinwald, J.** (2003) Alkaloid-derived pheromones and sexual selection in *Lepidoptera*. In: Blomquist, G. und Vogt, R. (Hrsg.) Insect pheromone. Biochemistry and molecular biology. Elsevier Academic Press, London, 341-368
- Endress, R.** (1994) Plant cells as producers of secondary compounds. In: Endress, R. (Hrsg.) Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, 121-255
- Facchini, P.J.; Johnson, A.G.; Poupart, J.; De Luca, V.** (1996) Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiol.* 111, 687-697
- Faddeeva, M.D. und Beliaeva, T.N.** (1997) Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular targets of their action. *Tsitologija* 39, 181-208
- Färber, K.; Schumann, B.; Miersch, O.; Roos, W.** (2003) Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry* 62, 491-500
- Fritsche, W.** (1988) Antagonistische Mikroben-Pflanzen-Interaktionen. In: Hecker, M. und Babel, W. (Hrsg.) Physiologie der Mikroorganismen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 203-213
- Geppert, L.J.** (2004) Hrsg. der Internetausgabe von: Hertel, H. und Schreiber, A. (1988) Die Botanische Staatssammlung München 1813 - 1988. Eine Übersicht über die Sammlungsbestände. *Mitt. Bot. Staatssamml. München* 26, 81-512;  
<http://www.botanik.biologie.uni-muenchen.de/botsyst/ic/ic-lic-k.htm>
- Gorinova, N.; Batchvarova, R.; Atanassov, A.** (1998) Effect of cercosporin on antioxidant enzymes and ion leakage in toxin-sensitive and -resistant cultivars of rice (*Oryza sativa*). *Biológia* 53, 727-730
- Granger, I.; Serradeil-le Gal, C.; Augereau, J.M.; Gleye, J.** (1992) Benzophenanthridine alkaloids isolated from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures interact with vasopressin (V1) receptors. *Planta Med.* 58, 35-38



**Grisebach, H.** (1981) Lignins. In: Stumpf, P.K. und Conn, E.E. (Hrsg.) The biochemistry of plants. Vol. 7 Secondary plant products. Academic Press, New York, 457-478

**Guédon, D.; Cappelaere, N.; Simanek, V.** (1990) HPLC analysis of the main alkaloids from *Eschscholtzia californica* Cham. *Phytochem. Anal.* 1, 77-82

**Gundlach, H.** (1992) Das Abwehrsystem der Pflanzen: Reinigung eines Elicitors und Induktion von Sekundärstoffen in pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation Fakultät Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München

**Gundlach, H.; Müller, M.J.; Kutchan, T.M.; Zenk, M.H.** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2389-2393

**Gundlach, H. und Zenk, M.H.** (1998) Biological activity and biosynthesis of pentacyclic oxylipins: the linoleic acid pathway. *Phytochemistry* 47, 527-537

**Haider, G.; Kislinger, T.; Kutchan, T.M.** (1997) Barbiturate induced benzophenanthridine alkaloid formation proceeds by gene transcript accumulation in the california poppy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 606-610

**Haider, G.; von Schrader, T.; Füllelein, M.; Blechert, S.; Kutchan, T.M.** (2000) Structure-activity relationships of synthetic analogs of jasmonic acid and coronatine on induction of benzo[c]phenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholtzia californica* cell cultures. *Biol. Chem.* 381, 741-748

**Harborne, J.B.** (1995a) Die Biochemie der Bestäubung. 42-82; (1995b) Pflanzengifte und ihre Auswirkungen auf Tiere. 83-122; (1995c) Hormonelle Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Tieren. 123-149; (1995d) Nahrungspräferenzen von Insekten. 150-190; (1995e) Nahrungspräferenzen von Wirbeltieren einschließlich des Menschen. 191-220; (1995f) Wechselbeziehungen zwischen höheren und niederen Pflanzen: Phytoalexine und Phytotoxine. 314-353. In: Harborne, J.B. (Hrsg.) Ökologische Biochemie. Eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

**Harborne, J.B.; Baxter, H.; Moss, G.P.** (1999) Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. Taylor & Francis, Padstow, 2. Auflage

**Hartmann, T. und Ober, D.** (2000) Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Top. Curr. Chem.* 209, 207-243

- Hauser, M.-T. und Wink, M.** (1990) Uptake of alkaloids by latex vesicles and isolated mesophyll vacuoles of *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Z. Naturforsch.* 45c, 949-957
- Heiser, I.; Oßwald, W.; Elstner, E.F.** (1998) The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 703-713
- Herbert, J.M.; Augereau, J.M.; Gleye, J.; Maffrand, J.P.** (1990) Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 993-999
- Hock, B.** (1995) Grundlagen toxischer Mechanismen: Hemmung wichtiger Funktionen durch Antibiotika und andere Zellgifte. In: Hock, B. und Elstner, E.F. (Hrsg.) *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage, 218-283
- Hsieh, P.-C.; Siegel, S.A.; Rogers, B.; Davis, D.; Lewis, K.** (1998) Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6602-6606
- Ikuta, A.; Syōno, K.; Furuya, T.** (1974) Alkaloids of callus tissues and redifferentiated plantlets in the Papaveraceae. *Phytochemistry* 13, 2175-2179
- Jain, L.; Tripathi, M.; Pandey, V.B.** (1996) Alkaloids of *Eschscholtzia californica*. *Planta Med.* 62, 188
- Jans, B.P.** (1973) Untersuchungen am Milchsaft des Schöllkrautes (*Chelidonium majus* L.). *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 83, 306-344
- Jasiński, M.; Stukkens, Y.; Degand, H.; Purnelle, B.; Marchand-Brynaert, J.; Boutry, M.** (2001) A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* 13, 1095-1107
- Jenns, A.E.; Scott, D.L.; Bowden, E.F.; Daub, M.E.** (1995) Isolation of mutants of the fungus *Cercospora nicotianae* altered in their response to singlet-oxygen-generating photosensitizers. *Photochem. Photobiol.* 61, 488-493
- Johnson, C.C.; Johnson, G.; Poe, C.F.** (1952) Toxicity of alkaloids to certain bacteria. II. Berberine, physostigmine, and sanguinarine. *Acta pharmacol. et toxicol.* 8, 71-78
- Kakiuchi, N.; Hattori, M.; Ishii, H.; Namba, T.** (1987) Effect of benzo[c]phenanthridine alkaloids on reverse transcriptase and their binding property to nucleic acids. *Planta Med.* 53, 22-27

- Kallberg, Y.; Oppermann, U.; Jörnvall, H.; Persson, B.** (2002) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur. J. Biochem.* 269, 4409-4417
- Kammerer, L.; De-Eknamkul, W.; Zenk, M.H.** (1994) Enzymic 12-hydroxylation and 12-O-methylation of dihydrochelirubine in dihydromacarpine formation by *Thalictrum bulgaricum*. *Phytochemistry* 36, 1409-1416
- Karioti, A.; Skaltsa, H.; Lazari, D.; Sokovic, M.; Garcia, B.; Harvala, C.** (2002) Secondary metabolites from *Centaurea deusta* with antimicrobial activity. *Z. Naturforsch.* 57c, 75-80
- Krane, B.D.; Fagbule, M.O.; Shamma, M.** (1984) The benzophenanthridine alkaloids. *J. Nat. Prod.* 47, 1-43
- Küppers, M.** (2001) Die Optimierung der Phytoalexin-Antwort in kultivierten Zellen von *Eschscholzia californica*. Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kutchan, T.M. und Dittrich, H.** (1995) Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 270, 24475-24481
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Leisman, G.B. und Daub, M.E.** (1992) Singlet oxygen yields, optical properties, and phototoxicity of reduced derivatives of the photosensitizer cercosporin. *Photochem. Photobiol.* 55, 373-379
- Lenfeld, J.; Kroutil, M.; Maršálek, E.; Slavík, J.; Preininger, V.; Šimánek, V.** (1981) Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Med.* 43, 161-165
- Li, Z.-S.; Alfenito, M.; Rea, P.A.; Walbot, V.; Dixon, R.A.** (1997) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry* 45, 689-693
- Linsmaier, E.M. und Skoog, F.** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, 100-127

**Maiti, M.; Das, S.; Sen, A.; Das, A.; Kumar, G.S.; Nandi, R.** (2002) Influence of DNA structures on the conversion of sanguinarine alkanolamine form to iminium form. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20, 455-464

**Marrs, K.A.** (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158

**Matile, P.** (1976) Localization of alkaloids and mechanism of their accumulation in vacuoles of *Chelidonium majus* laticifers. In: Luckner, M.; Mothes, K.; Nover, L. (Hrsg.) Secondary metabolism and coevolution. *Nova Acta Leopoldina*, Suppl. 7, 139-156

**Matile, P.** (1984) Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. *Naturwissenschaften* 71, 18-24

**Mende, P. und Wink, M.** (1987) Uptake of the quinolizidine alkaloid lupanine by protoplasts and isolated vacuoles of suspension-cultured *Lupinus polyphyllus* cells. Diffusion or carrier-mediated transport? *J. Plant. Physiol.* 129, 229-242

**Michal, G.; Möllering, H.; Siedel, J.** (1983) Chemical design of indicator reactions for the visible range. In: Bergmeyer, H.-U. (Hrsg.) Methods of enzymatic analysis. Vol. 1 Fundamentals, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Ausgabe, 197-232

**Miller, J.M. und Conn, E.E.** (1980) Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant physiol.* 65, 1199-1202

**Mitchell, T.K.; Chilton, W.S.; Daub, M.E.** (2002) Biodegradation of the polyketide toxin cercosporin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4173-4181

**Modriansky, M.; Kosina, P.; Kesselova, M.; Walterova, D.; Simanek, V.; Ulrichova, J.** (2001) Interaction of sanguinarine and chelerythrine with selected human cytochrome P450 isoforms. FYS320;  
<http://congres.igh.cnrs.fr/P450-Grande-Motte/abstractp450.pl?action=visu&fys=all>

**Møller, I.M.** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561-591

**Morrissey, J.P. und Osbourn, A.E.** (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 708-724

**Moss, G.P.** (2004a) Hrsg. der Internetausgabe von: Enzyme nomenclature. Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzyme-catalysed reactions.  
<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme>

**Moss, G.P.** (2004b) Mechanism of the rearrangement of 6-hydroxyprotopine to dihydro-sanguinarine. In: Moss, G.P. (Hrsg. der Internetausgabe) Enzyme nomenclature.  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/alkaloid/rearrange.html>

**Mueller, M.J.; Brodschelm, W.; Spannagl, E.; Zenk, M.H.** (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7490-7494

**Mueller, L.A.; Goodman, C.D.; Silady, R.A.; Walbot, V.** (2000) AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123, 1561-1570

**Nakajima, K.; Hashimoto, T.; Yamada, Y.** (1993) Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9591-9595

**Neumann, D.; Lösecke, W.; Maier, W.; Gröger, D.** (1979) Localization of alkaloids in sclerotia and suspension cultures of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 174, 504-508

**Neumann, D.** (1985) Storage of alkaloids. In: Mothes, K.; Schütte, H.R.; Luckner, M. (Hrsg.) Biochemistry of alkaloids. Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 49-55

**Newman, S.E.; Roll, M.J.; Harkrader, R.J.** (1999) A naturally occurring compound for controlling powdery mildew of greenhouse roses. *Hortscience* 34, 686-689

**Oba, K.; Conn, E.E.; Canut, H.; Boudet, A.M.** (1981) Subcellular localization of 2-( $\beta$ -D-glucosyloxy)-cinnamic acids and the related  $\beta$ -glucosidase in leaves of *Melilotus alba* Desr. *Plant Physiol.* 68, 1359-1363

**Ohno, S.; Nakajin, S.; Shinoda, M.** (1991) 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of neonatal pig testis: 3 $\alpha$ / $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities catalyzed by highly purified enzyme. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38, 787-794

**Okada, N.; Shinmyo, A.; Okada, H.; Yamada, Y.** (1988) Purification and characterization of (S)-tetrahydroberberine oxidase from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry* 27, 979-982

**Osborn, A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831

**Oßwald, W.** (1995) Die Wirt-Parasit-Beziehungen: Bakterien und Pilze als Parasiten. In: Hock, B. und Elstner, E.F. (Hrsg.) *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage, 315-369

**Pauli, H.H. und Kutchan, T.M.** (1998) Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-*N*-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J.* 13, 793-801

**Preininger, V.** (1986) Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. In: Manske, R.H.F. (Hrsg.) *The Alkaloids: chemistry and physiology*. Academic Press, New York, 29, 1-98

**Raguso, R.A.** (2003) Olfactory landscapes and deceptive pollination: signal, noise and convergent evolution in floral scent. In: Blomquist, G. und Vogt, R. (Hrsg.) *Insect pheromone. Biochemistry and molecular biology*. Elsevier Academic Press, London, 631-650

**Rea, P.A.; Li, Z.-S.; Lu, Y.-P.; Drozdowicz, Y.M.** (1998) From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 727-760

**Rollins, J.A.; Ehrenshaft, M.; Upchurch, R.G.** (1993) Effects of light- and altered-cercosporin phenotypes on gene expression in *Cercospora kikuchii*. *Can. J. Microbiol.* 39, 118-124

**Roos, W. und Luckner, M.** (1986) The spatial organization of secondary metabolism in microbial and plant cells. In: Subramanian, T.A.V. (Hrsg.) *Cell metabolism: growth and environment*. Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 45-73

**Roos, W.; Evers, S.; Hieke, M.; Tschöpe, M.; Schumann, B.** (1998) Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Physiol.* 118, 349-364

**Roos, W.; Dordschbal, B.; Steighardt, J.; Hieke, M.; Weiss, D.; Saalbach, G.** (1999) A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1448, 390-402

**Russin, W.A.; Ellis, D.D.; Gottwald, J.R.; Zeldin, E.L.; Brodhagen, M.; Evert, R.F.** (1995) Immunocytochemical localization of taxol in *Taxus cuspidata*. *Int. J. Plant Sci.* 156, 668-678

**Sakai, K.; Shitan, N.; Sato, F.; Ueda, K.; Yazaki, K.** (2002) Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *J. Exp. Bot.* 53, 1879-1886

**Sato, H.; Taguchi, G.; Fukui, H.; Tabata, M.** (1992) Role of malic acid in solubilizing excess berberine accumulating in vacuoles of *Coptis japonica*. *Phytochemistry* 31, 3451-3454

**Schafer, F.Q. und Buettner, G.R.** (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191-1212

**Scheiner-Bobis, G.** (2001) Sanguinarine induces K<sup>+</sup> outflow from yeast cells expressing mammalian sodium pumps. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 363, 203-208

**Schmeller, T.; Latz-Brüning, B.; Wink, M.** (1997) Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44, 257-266

**Schnepf, E.** (1973) Sezernierende und exzernierende Zellen in Pflanzen. In: Hirsch, G.C.; Ruska, H.; Sitte, P. (Hrsg.) *Grundlagen der Cytologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 461-477

**Schumacher, H.-M.; Gundlach, H.; Fiedler, F.; Zenk, M.H.** (1987) Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Rep.* 6, 410-413

**Schumacher, H.-M. und Zenk, M.H.** (1988) Partial purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 7, 43-46

**Seifen, E.; Adams, R.J.; Riemer, R.K.** (1979) Sanguinarine: a positive inotropic alkaloid which inhibits cardiac Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Eur. J. Pharmacol.* 60, 373-377

- Sen, A.; Ray, A.; Maiti, M.** (1996) Thermodynamics of the interactions of sanguinarine with DNA: influence of ionic strength and base composition. *Biophys. Chem.* 59, 155-170
- Sen, A. und Maiti, M.** (2002) Interaction of sanguinarine with double stranded RNA structures. *Indian J. Biochem. Biophys.* 39, 106-112
- Slavík, J. und Slavíková, L.** (1955) Alkaloide der Mohngewächse (Papaveraceae) III. Alkaloide des kalifornischen Kappen-Mohns (*Eschscholtzia californica* Cham.). *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 20, 27-30
- Stermitz, F.R.; Lorenz, P.; Tawara, J.N.; Zenewicz, L.A.; Lewis, K.** (2000) Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1433-1437
- Takao, N.; Kamigauchi, M.; Okada, M.** (1983) Biosynthesis of benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine, chelirubine and macarpine. *Helv. Chim. Acta* 66, 473-484
- Tanahashi, T. und Zenk, M.H.** (1990a) Elicitor induction and characterization of microsomal protopine-6-hydroxylase, the central enzyme in benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 29, 1113-1122
- Tanahashi, T. und Zenk, M.H.** (1990b) New hydroxylated benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.* 53, 579-586
- Teuscher, E.** (1984) Zur möglichen Funktion von Sekundärstoffen in biologischen Systemen. In: Czygan, F.-C. (Hrsg.) Biogene Arzneistoffe. Entwicklungen auf dem Gebiet der Pharmazeutischen Biologie, Phytochemie und Phytotherapie. Vieweg, Braunschweig, 61-83
- Teuscher, E.** (1997) Alkaloide. In: Teuscher, E. (Hrsg.) Biogene Arzneimittel. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 5. Auflage, 313-377
- Thoma, I.; Krischke, M.; Loeffler, C.; Mueller, M.J.** (2004) The isoprostanoid pathway in plants. *Chem. Phys. Lipids* 128, 135-148
- Tolkachev, O.N. und Vichkanova, S.A.** (1978) Dependence of antimicrobial activity on the structure and reactivity of natural quaternary heteroaromatic compounds and their analogues. *Farmacija* 27, 38-41
- Tomè, F.; Colombo, M.L.; Caldiroli, L.** (1999) A comparative investigation on alkaloid composition in different populations of *Eschscholtzia californica* Cham. *Phytochem. Anal.* 10, 264-267



**Ulrichová, J.; Walterová, D.; Preininger, V.; Slavík, J.; Lenfeld, J.; Cushman, M.; Šimánek, V.** (1983a) Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 48, 111-115

**Ulrichová, J.; Walterová, D.; Preininger, V.; Šimánek, V.** (1983b) Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 48, 174-177

**Ulrichová, J.; Walterová, D.; Šimánek, V.** (1984) Molecular mechanisms of the biological activity of quaternary benzophenanthridine and protoberberine alkaloids. *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.* 106, 31-38

**United States National Arboretum** (2004) State trees and state flowers.  
<http://www.usna.usda.gov/Gardens/collections/statetreeflower.html>

**Vallejos, R.H.** (1973) Uncoupling of photosynthetic phosphorylation by benzophenanthridine alkaloids. *Biochim. Biophys. Acta* 292, 193-196

**Vandenbogaerde, A.L.; Delaey, E.M.; Vantieghem, A.M.; Himpens, B.E.; Merlevede, W.J.; de Witte, P.A.** (1998) Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 67, 119-125

**van den Brûle, S.; Müller, A.; Fleming, A.J.; Smart, C.C.** (2002) The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal diterpene sclareol. *Plant J.* 30, 649-662

**VanEtten, H.D.; Matthews, D.E.; Matthews, P.S.** (1989) Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 143-164

**Vavreckova, C.; Gawlik, I.; Mueller, K.** (1996a) Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. 1. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Med.* 62, 397-401

**Vavreckova, C.; Gawlik, I.; Mueller, K.** (1996b) Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. 2. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. *Planta Med.* 62, 491-494

**Ververidis, P.; Davrazou, F.; Diallinas, G.; Georgakopoulos, D.; Kanellis, A.K.; Panopoulos, N.** (2001) A novel putative reductase (Cpd1p) and the multidrug exporter Snq2p are involved in resistance to cercosporin and other singlet oxygen-generating photosensitizers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 39, 127-136

**Vichkanova, S.A.; Rubinchik, M.A.; Adgina, V.V.; Fedorchenko, T.S.** (1969) A study into chemotherapeutic action of sanguinarine. *Farmakol. toksikol.* 32, 325-328

**Vichkanova, S.A. und Adgina, V.V.** (1971) Antifungal properties of sanquinarine [!]. *Antibiotiki* 16, 609-612

**Viehweger, K.; Dordschbal, B.; Roos, W.** (2002) Elicitor-activated phospholipase A<sub>2</sub> generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H<sup>+</sup> pool for pH signaling via the activation of Na<sup>+</sup>-dependent proton fluxes. *Plant Cell* 14, 1509-1525

**Viehweger, K.** (2003) Der Protonentransport an der Vakuole - ein Signalschritt zur Auslösung der Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden in *Eschscholzia californica*. Dissertation Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Villegas, M.; León, R.; Brodelius, P.E.** (1999) Effects of alginate and immobilization by entrapment in alginate on benzophenanthridine alkaloid production in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Biotechnol. Lett.* 21, 49-55

**Wang, C.; Wu, J.; Mei, X.** (2001) Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 404-410

**Weiler, E.W.** (1997) Octadecanoid-mediated signal transduction in higher plants. *Naturwissenschaften* 84, 340-349

**Williams, M.K.; Dalvi, S.; Dalvi, R.R.** (2000) Influence of 3-Methylcholanthrene pretreatment on sanguinarine toxicity in mice. *Vet. Human Toxicol.* 42, 196-198

**Wink, M.** (1999) Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: Wink, M. (Hrsg.) Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual Plant Reviews* 2, Sheffield Academic Press, Sheffield, 1-16

**Wolff, J. und Knipling, L.** (1993) Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry* 32, 13334-13339

**Zenk, M.H.** (1995) Chasing the enzymes of alkaloid biosynthesis. In: Golding, B.T. u. a. (Hrsg.) Organic reactivity: physical and biological aspects. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 89-109

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ABC	ATP binding cassette
Aqua demin.	Aqua demineralisata
ATP	Adenosintriphosphat
BBE	Berberinbrückenzym
BPA	Benzophenanthridin-Alkaloid
Cyt P-450	Cytochrom P-450
DH...	Dihydro...
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrit
<i>dto.</i>	dasselbe
DTT	Dithiothreit
EC <sub>50</sub>	effective concentration 50 %
Em	Emission
EtAc	Ethylacetat
Ex	Exzitation
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid (oxidiert)
FADH <sub>2</sub>	Flavin-adenin-dinucleotid (reduziert)
FM	Frischmasse
FPLC	fast performance liquid chromatography
× g	relative Zentrifugalkraft
grad. grade	gradient grade
GSH	Glutathion (reduziert)
HPLC	high performance liquid chromatography
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50 %
INT	Jodnitrotetrazoliumchlorid
kDa	Kilodalton
LMW	low molecular weight
M	Molekül- bzw. Molmasse
MALDI TOF	matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight

---

MDR	multidrug resistance
MeOH	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MIC	minimale Hemmkonzentration
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)
NL-P	phosphatfreie Nährlösung
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
OH...	Hydroxy...
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Rf	Retentionsfaktor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSA	Rinderserumalbumin
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH-	Sulfhydryl-
STOX	(S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase
TM	Trockenmasse
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit (Internationale Einheit)

## 9 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen:

Abb. 1	Reversible Reduktion von Cercosporin als Resistenzmechanismus in <i>Cercospora</i>	11
Abb. 2	Verkürzte Darstellung der Biosynthese der Benzo[c]phenanthridine	17
Abb. 3	Schematische Darstellung der Benzophenanthridin-Biosynthese mit Verzweigungspunkten innerhalb der Isochinolinalkaloid-Synthese	18
Abb. 4	Chemische Strukturen der Iminium- sowie Alkanolamin-Form des Sanguinarins	19
Abb. 5	HPLC-Trennung der aus elicitierten Kulturmedien isolierten Benzophenanthridine	28
Abb. 6	Alkaloidbildung in Zellsuspensionen von <i>Eschscholzia californica</i>	45
Abb. 7	Dynamik der Alkaloidbildung nach Elicitierung	46
Abb. 8	Verteilung der Alkaloide zwischen Zellen und Außenmedium nach 24- bzw. 72-stündiger Elicitorbehandlung	47
Abb. 9	Abfall der Außenkonzentration von Benzophenanthridinen bei Inkubation mit Zellsuspensionen von <i>E. californica</i>	49
Abb. 10	Umwandlung von extern zugesetztem Sanguinarin durch Zellsuspensionen	50
Abb. 11	Fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Inkubation von Zellsuspensionen mit Sanguinarin	51
Abb. 12	HPLC-Trennung der nach Inkubation von Zellsuspensionen mit Sanguinarin bzw. Chelerythrin extrahierten Alkaloide	53
Abb. 13	Chemische Strukturen der Benzophenanthridine Sanguinarin und Chelerythrin	54
Abb. 14	Aufnahme und Umwandlung verschiedener Benzophenanthridine durch Zellsuspensionen von <i>E. californica</i>	55
Abb. 15	Modell zur Aufnahme und Metabolisierung verschiedener Benzophenanthridine durch Zellsuspensionen von <i>E. californica</i>	57
Abb. 16	Vergleich der Aktivitäten von Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase und Sanguinarin-Reduktase im 100 000 g-Überstand sowie in der > 30 kDa-Proteinfraction	60
Abb. 17	Hydrophobe Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose 6 FF	62

---

Abb. 18	Anionenaustauschchromatographie auf Q Sepharose FF	62
Abb. 19	Gelfiltration auf Superdex 200 pg	63
Abb. 20	Anionenaustauschchromatographie auf Mono Q	63
Abb. 21	Gelfiltration und Bestimmung der Molekülmasse auf Superose 12	65
Abb. 22	SDS-PAGE der aktiven Sanguinarin-Reduktase-Fractionen in verschiedenen Reinigungsstufen	66
Abb. 23	Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der Sanguinarin-Reduktase	67
Abb. 24	Abhängigkeit der Reduktase-Aktivität von der Konzentration an Sanguinarin bzw. NAD(P)H	69
Abb. 25	UV-Absorptionsspektren der Substrate bzw. Endprodukte des Sanguinarin-Reduktase-Assays	70
Abb. 26	Nachweis der stöchiometrischen Umsetzung von Benzophenanthridinen und NADPH durch die Sanguinarin-Reduktase	71
Abb. 27	Spezifität der Reduktion	74
Abb. 28	Massenspektrometrischer Nachweis der Bildung von Dihydrosanguinarin und Dihydrochelerythrin durch die Sanguinarin-Reduktase-Reaktion	75
Abb. 29	Abhängigkeit der Reduktase-Aktivität von der Konzentration an Alkaloid bzw. NAD(P)H	76
Abb. 30	Reversible Umwandlung von Protoberberinen zu (R)-konfigurierten Tetrahydroprotoberberinen durch die Berberin-Reduktase	77
Abb. 31	Strukturanaloga der Benzophenanthridin-Alkaloide sowie ausgewählte Substrate der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen	78
Abb. 32	SDS-PAGE der gereinigten Sanguinarin-Reduktase	80
Abb. 33	HPLC-Trennung der Peptidbruchstücke nach Spaltung des Sanguinarin-Reduktase-Proteins mit Trypsin	81
Abb. 34	Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen von zwei tryptischen Peptiden des Sanguinarin-Reduktase-Proteins mit Sequenzen der aus Reis bekannten putativen 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Isomerase	82
Abb. 35	Test verschiedener Elektronendonatoren auf Reduktion von Sanguinarin in der > 10 kDa-Proteinfraktion	87
Abb. 36	Zusammenspiel von Sanguinarin-Ausscheidung und Wiederaufnahme in Zellsuspensionen von <i>Eschscholzia californica</i>	89

**Tabellen:**

Tab. 1	Enzymatische Metabolisierung verschiedener Phytoalexine durch pathogene Pilze	10
Tab. 2	Übersicht der in <i>Eschscholzia californica</i> identifizierten Benzo[c]phenanthridine	14
Tab. 3	Exzitations- und Emissionsmaxima verschiedener Benzophenanthridin-Alkaloide	25
Tab. 4	Übersicht der in der verwendeten <i>Eschscholzia</i> -Kultur identifizierten Benzophenanthridine	30
Tab. 5	Zusammensetzung der für die FPLC-Reinigung verwendeten Pufferlösungen	34
Tab. 6	Reinigungstabelle (detailliert)	37
Tab. 7	Übersicht zur Metabolisierung verschiedener Konzentrationen an Sanguinarin durch Zellsuspensionen von <i>E. californica</i>	52
Tab. 8	Reinigungstabelle der Sanguinarin-Reduktase	66
Tab. 9	Substrat- und Reaktionsspezifität der Sanguinarin-Reduktase	79

## **Danksagung**

Abschließend möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen - sei es durch fachliche Unterstützung oder durch aufmunternde Worte.

Herr Prof. Dr. W. Roos gab mir die Möglichkeit, am Forschungsprojekt seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten und begleitete mich ideenreich und diskussionsbereit über Höhen und durch Tiefen des Laboralltags.

Herzlich danken möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie für die gute Zusammenarbeit, für all die großen und kleinen Hilfestellungen. Besonders werden mir die interessanten Gespräche und Diskussionen in Erinnerung bleiben, die erheblich zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Herr Dr. A. Baumert vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle) stand mir während der Proteinreinigung hilfreich zur Seite. Die Sequenzanalysen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. K.-P. Rücknagel (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) durchgeführt.

Für die zahlreichen massenspektrometrischen Untersuchungen sowie hilfreichen Anmerkungen zur Auswertung der entsprechenden Ergebnisse danke ich Frau Dr. A. Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle).

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern für ihre vielfältige Unterstützung, für ihr Verständnis und die stetige Ermutigung. Nicht vergessen sind die aufheiternden Worte meiner Schwester Uta.

Allen Freunden und Verwandten danke ich für die vielen schönen Erlebnisse, welche mir den nötigen Abstand, aber auch Kraft für meine Arbeit gaben.

Und nicht zuletzt wurde mir durch finanzielle Unterstützung das intensive Arbeiten an der Erstellung des Manuskriptes ermöglicht - Danke!



## **Lebenslauf**

Name: Dagmar Weiß  
Geburtstag: 06.07.1974  
Geburtsort: Schlema (Erzgebirge)  
Familienstand: ledig

## **Schulbildung**

1981 - 1990 Polytechnische Oberschule, Zschorlau  
1990 - 1993 Gymnasium, Aue; Abitur

## **Studium**

1993 - 1997 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

## **Praktisches Jahr**

Okt. 1997 - März 1998 Apotheke Silberhöhe, Halle  
April 1998 - Sept. 1998 Institut für Pharmazeutische Biologie, Abteilung  
Zellphysiologie/Biotechnologie, Fachbereich Pharmazie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg;  
Diplomarbeit zum Thema »Fluoreszenzmikroskopische  
Bestimmung der Phospholipase A-Aktivität in elicierten  
Einzelzellen von *Eschscholzia californica*«  
Febr. 1999 Approbation als Apothekerin

## **Berufstätigkeit**

April 1999 - Juni 2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für  
Pharmazeutische Biologie und Pharmakologie,  
Abt. Molekulare Zellbiologie, Fachbereich Pharmazie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
seit Juli 2003 Anfertigung einer Dissertation

Halle (Saale), August 2004

Dagmar Weiß

## **Erklärung**

Hiermit bestätige ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), August 2004

Dagmar Weiß