

Isolierung und Charakterisierung der γ -Tocopherolmethyltransferase

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Maria Koch
aus Leinefelde**

Göttingen 2001

D7

Referent: Prof. Dr. Hans W. Heldt

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dieter Heineke

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2001

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	<i>Struktur, Vorkommen und Wirkungsweise des Vitamin E (Tocopherol)</i>	5
1.1.1	Struktur und Vorkommen des Vitamin E	5
1.1.2	Wirkungsweise und Bedeutung des Vitamin E	6
1.2	<i>Tocopherolbiosynthese</i>	12
1.3	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	<i>Pflanzenmaterial</i>	16
2.1.1	Paprika	16
2.1.2	Anzucht der Grünalgen	16
2.1.2.1	Grünalge - <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
2.1.2.2	Grünalge - <i>Chlorella sorottiana</i>	16
2.1.2.3	Grünalge - <i>Dunaliella bioculata</i>	17
2.1.3	Transformierte <i>E.coli</i> -Kulturen	17
2.1.4	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.2	<i>Bestimmung der Tocopherole mittels HPLC</i>	18
2.2.1	Aufarbeitung, Lyophilisierung und Trockengewichtsbestimmung	18
2.2.2	Isooctan – Extraktion	18
2.2.3	n-Hexan – Isopropanol – Extraktion für Grünalgen	18
2.2.4	HPLC – Messung	18
2.3	<i>Lipidanalyse</i>	20
2.4	<i>Reinigung der γ-Tocopherolmethyltransferase (γ-TMT) aus Capsicum annuum</i>	21
2.4.1	Isolierung von Chromoplasten aus Paprika	21
2.4.2	Messung der α -Tocopherol-Synthese	21
2.4.3	Messung der 2,3-Dimethylphytylhydrochinon- und γ -Tocopherol-Synthese	22
2.4.4	Herstellung des Acetonpulvers	23
2.4.5	Solubilisierung und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Fällung der γ -Tocopherolmethyltransferase	23
2.4.6	Säulenchromatographie	24
2.4.6.1	Verwendete Puffersysteme	24
2.4.6.2	Anionenaustauscher-Chromatographie (2,6 cm x 30 cm, DEAE – Sepharose Fast Flow)	25
2.4.6.3	Anionenaustauscher-Rechromatographie (1,6 cm x 12 cm, DEAE – Sepharose Fast Flow)	26
2.4.6.4	Proteintrennung durch hydrophobe Wechselwirkungen (1,6 cm x 10 cm, Hydroxylapatit)	26

2.4.6.5	Affinitätschromatographie (1,6 cm x 8 cm, Blue Sepharose Fast Flow)	26
2.4.7	Denaturierende Gelfiltration (BioSep-SEC-S3000, HPLC gestützte Reinigung)	26
2.4.8	Konzentrierung der Enzymlösungen	27
2.4.9	Molekulargewichtsabschätzung	27
2.4.9.1	Nativ: Gelfiltration (Superdex 200 HR 30/10)	27
2.4.9.2	Denaturiert: SDS-PAGE	28
2.4.9.3	Photoaffinitäts – Markierung mit [¹⁴ C]-SAM	28
2.4.10	Chromatofocussing	28
2.5	<i>Rekombinante γ-TMT aus Arabidopsis</i>	28
2.5.1	Anzucht der transformierten <i>E.coli</i> -Kulturen	28
2.5.2	Lysat Präparation	29
2.5.3	Reinigung des nativen rekombinanten Enzyms	29
2.5.4	Messung der α -Tocopherol-Biosynthese	30
2.6	<i>Elektrophorese</i>	31
2.6.1	SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese	31
2.6.1.1	Aufarbeitung der Proben	31
2.6.1.2	Zusammensetzung der Gele und Elektrophoresebedingungen	31
2.6.1.3	Färbung der Gele	34
2.6.1.3.1	<i>Silberfärbung</i>	34
2.6.1.3.2	<i>Coomassie – Färbung</i>	34
2.7	<i>Proteinanalyse durch „Western Blotting“</i>	35
2.7.1	Blotting	35
2.7.2	Amidoschwarz-Färbung	36
2.7.3	Ponceaurot-Färbung	36
2.7.4	Immunfärbung	37
2.8	<i>Proteinbestimmung</i>	38
2.9	<i>Proteinfällung durch Chloroform – Methanol</i>	39
2.10	<i>Darstellung der Vorstufen der α-Tocopherolbiosynthese</i>	40
2.10.1	Darstellung von 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon	40
2.10.2	Darstellung von 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-hydrochinon	40
2.10.3	NMR Untersuchung	40
2.11	<i>Statistische Auswertung der durchgeführten Experimente</i>	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	<i>Untersuchung der Tocopherolgehalte bei Höheren Pflanzen und Grünalgen</i>	43

3.2	<i>Untersuchung verschiedener Varietäten von Capsicum annum</i>	44
3.3	<i>Reinigung der γ-Tocopherolmethyltransferase aus Fruchtschalen von Capsicum annum der roten Varietät</i>	45
3.3.1	Elutionsprofile	47
3.3.1.1	Konventionelle Reinigung	47
3.3.1.2	HPLC-gestützte Reinigung	49
3.3.2	Reinigungstabelle	51
3.3.3	Reinigung anhand der SDS-PAGE	51
3.3.4	Proteinsequenzen	53
3.4	<i>Charakterisierung der γ-TMT aus Fruchtperikarp von Capsicum annum der roten Varietät</i>	54
3.4.1	Abschätzung der Molekülmasse	54
3.4.1.1	Native Gelfiltration an Superdex 200	54
3.4.1.2	Photolabelling mit AdoMet	55
3.4.2	Temperaturmaximum	57
3.4.3	pH-Abhängigkeit	57
3.4.4	Abhängigkeit der γ -TMT Aktivität von der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit	58
3.4.5	Substratspezifität und kinetische Charakterisierung der γ -TMT	59
3.4.5.1	Substratspezifitäten der γ -Tocopherolmethyltransferase	59
3.4.5.2	Kinetische Charakterisierung der γ -Tocopherolmethyltransferase	61
3.5	<i>Kinetische Charakterisierung der γ-TMT aus Fruchtperikarp von Capsicum annum der gelben Varietät</i>	64
3.6	<i>Rekombinanten γ-TMT aus Arabidopsis thaliana</i>	65
3.6.1	Anzucht der <i>E. coli</i> -Kultur	65
3.6.2	Reinigung an Nickel-Agarose	66
3.6.3	pH-Abhängigkeit und pH-Stabilität	67
3.6.4	Temperaturabhängigkeit	68
3.6.5	Einfluß von Detergenzien, reduzierenden Substanzen und der Salzkonzentration auf die Enzymaktivität	69
3.6.5.1	Salzkonzentration	69
3.6.5.2	Detergenzien und reduzierende Substanzen	71
3.6.6	Stabilisierung der γ -TMT aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
3.6.7	Abhängigkeit der γ -TMT-Aktivität von der Proteinmenge und der Zeit	73
3.6.8	Substratspezifität und kinetische Charakterisierung der rekombinanten γ -TMT aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
3.6.9	Reaktionsmechanismus der rekombinanten γ -TMT	78
3.7	<i>γ-TMT-Antisense bei Arabidopsis thaliana</i>	83
3.7.1	Pflanzen der F1-Generation	83

3.7.2	Pflanzen der F2-Generation	84
4	DISKUSSION	89
4.1	<i>Zusammenhang zwischen Tocopherol- und Lipidgehalt</i>	89
4.2	<i>γ-Tocopherolmethyltransferase</i>	90
4.2.1	Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase aus <i>Capsicum annuum</i>	90
4.2.2	Charakterisierung der γ -Tocopherolmethyltransferase aus <i>Capsicum annuum</i> (rote Varietät)	91
4.2.3	Charakterisierung der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	94
4.2.4	Reaktionsmechanismus der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	96
4.2.5	γ -Tocopherolmethyltransferase-Antisense-Pflanzen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
4.3	<i>Weiterführende Experimente</i>	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	103
7	LITERATURVERZEICHNIS	105

1 Einleitung

1.1 Struktur, Vorkommen und Wirkungsweise des Vitamin E (Tocopherol)

1.1.1 Struktur und Vorkommen des Vitamin E

Das Vitamin E wurde 1936 erstmals von Evans et al. aus dem Öl von Weizenkeimlingen isoliert. Zwei Jahre später wurde dann von Fernholz (1938) die Struktur des Vitamins aufgeklärt.

In der Natur kommen acht Derivate des 6-Chromanols mit Vitamin E-Aktivität vor. Diese acht Derivate gehören zu zwei Gruppen, den Tocopherolen und den Tocotrienolen, welche sich nur in ihren Seitenketten unterscheiden. Die Tocopherole besitzen einen gesättigten Phitylrest und die Tocotrienole einen ungesättigten Geranylgeranyl-Rest. Die vier Verbindungen der Tocopherole und Tocotrienole unterscheiden sich nur in ihren Methylgruppen, wie in Abbildung 1-1 zu sehen ist.

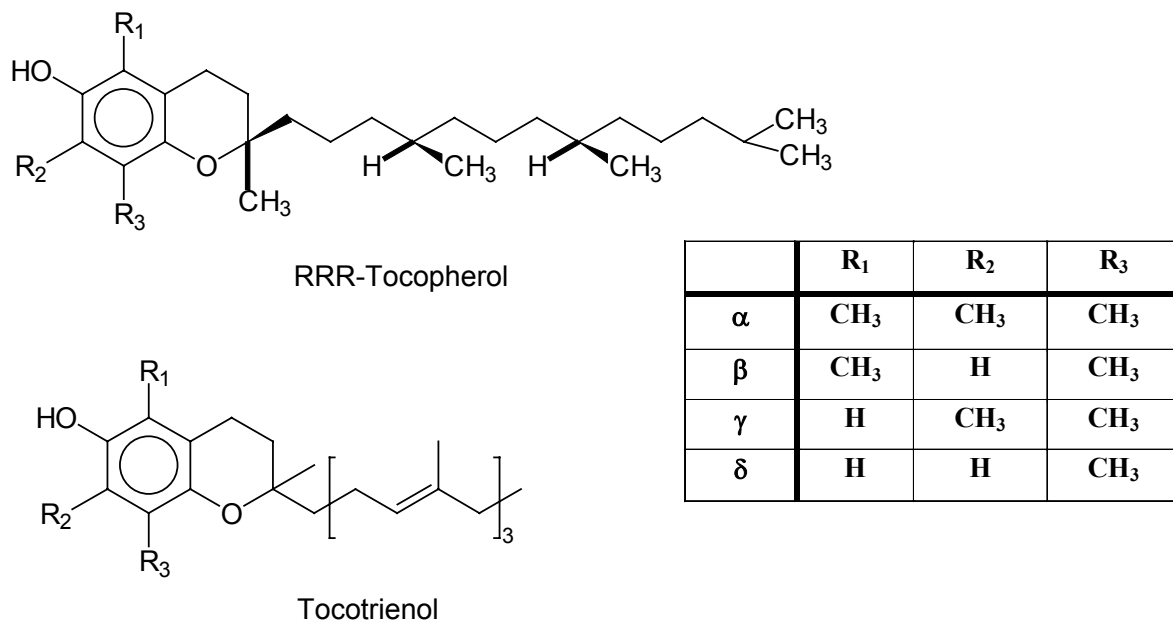


Abbildung 1-1 Tocopherole und Tocotrienole

Die Tocopherole wurden in allen untersuchten Höheren Pflanzen gefunden (Bucke et al. 1966; Lichtenthaler 1968). Es ist bekannt, daß durch den relativen Gehalt der Tocopherole das Samenöl von verschiedenen Kulturpflanzen charakterisiert werden kann. Das Keimöl von Weizen enthält zum Beispiel 60% α -Tocopherol und 23% δ -Tocopherol, das Leinöl enthält dagegen 76% γ -Tocopherol und 24% Plastochromanol-8, welches ein ungewöhnliches Tocol-Derivat bei Pflanzenölen ist (Balz et al. 1992). In Sojabohnenöl beträgt der Anteil des δ -Tocopherols 30% des Gesamttocopherols (van Niekerk et al. 1985; Yoshida 1990). Die Tocotrienole findet man in höherem Anteil in dem Öl von Palmen. In diesem Zusammenhang soll die strenge Korrelation zwischen dem Tocopherol-Gehalt pflanzlicher Öle und ihrem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren nicht unerwähnt bleiben.

Im Gegensatz zu Pflanzen können Säugetiere Vitamin E nicht selbst synthetisieren. In tierischen Geweben und Fetten findet man hauptsächlich α -Tocopherol bei mittleren Gehalten von 15 $\mu\text{g/g}$ (Bauernfeind, 1980), wobei Fettgewebe mit 150 $\mu\text{g/g}$ die höchste und Erythrocyten mit 2 $\mu\text{g/g}$ die niedrigste Vitamin-E-Konzentration aufweisen.

Untersuchungen zum Vitamin-E-Gehalt verschiedener Mikroorganismen zeigen, daß Grünalgen hauptsächlich α -Tocopherol, die untersuchten Rotalgen und Hefen aber kein Tocopherol bilden (Skinner et al. 1968). Powls und Mitarbeiter fanden 1967 α - und γ -Tocopherol in dem Cyanobacterium *Anabaena variabilis* sowie α -Tocopherol in den Blaualgen *Nostoc muscorum* und *Fremyella diplosyphon*, jedoch kein Tocopherol in dem Cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Im Gegensatz hierzu wurde jedoch von Dasilva und Mitarbeitern 1971 α -Tocopherol in *Anacystis nidulans* festgestellt. Es existieren bislang keine Hinweise für das Vorkommen von Tocotrienolen in Mikroorganismen.

1.1.2 Wirkungsweise und Bedeutung des Vitamin E

Tocopherole sind amphipatische Moleküle, deren hydrophobe Phytol-Reste in der Biomembran verankert sind und deren polare Chromanol-Kopfgruppen an der dem Cytosol zugekehrten Membranoberfläche zu finden sind. Dort können sie mit anderen Biomolekülen in Kontakt treten (Fryer 1992; Wang und Quinn 1999).

Die biologisch aktivste Verbindung ist das α -Tocopherol, in dem alle drei Chiralitätszentren in der R-Konfiguration vorliegen. Die vier Tocotrienole zeigen im Vergleich zu den Tocopherolen verminderte biologische Aktivität (Pennock et al. 1964). Der klassische Test zur Bestimmung der biologischen Wirksamkeit von Vitamin E ist eine Weiterentwicklung des Antisterilitätstestes nach Evans durch Brubacher und Weiser (1967). Der Antisterilitätstest

stützt sich auf die Tatsache, daß trächtige Ratten bei Vitamin E-Mangel nicht imstande sind, ihre Jungen normal auszutragen. Die Jungen sterben in der Regel gegen Ende der Tragzeit ab. In Tabelle 1-1 ist die relative Wirksamkeit verschiedener Tocopherole und Tocotrienole im Antisterilitätstest gezeigt.

Substanz	relative Wirksamkeit in %
α -Tocopherol	100
β -Tocopherol	25-40
γ -Tocopherol	8-19
δ -Tocopherol	0,7
α -Tocotrienol	21
β -Tocotrienol	4

Tabelle 1-1: Relative Vitamin-E-Wirksamkeit verschiedener Tocopherole und Tocotrienole im Antisterilisationstest nach Brubacher und Weiser (1967).

In der Literatur der letzten 10 Jahre wurden neue Hypothesen zur Wirkungsweise von Vitamin E publiziert, die vor allem die physikochemischen Eigenschaften der E-Vitamine in Betracht ziehen. In Fachkreisen anerkannt ist die Antioxidantienhypothese, welche besagt, daß Vitamin E in zellulären Membransystemen die Autoxidation ungesättigter Fette verhindert, diese also vor dem „Ranzigwerden“ schützt.

Burton und Ingold zeigten 1981, daß α -Tocopherol *in vitro* die höchste Wirkung als Kettenreaktions-Terminations-Antioxidans aufweist. Kommerzielle Antioxidantien wie BHA und BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol) sind dem α -Tocopherol in ihrer Wirkung weit unterlegen. Burton und Mitarbeiter schlugen 1983 vor, daß Vitamin E aufgrund seines lipophilen Charakters bevorzugt in Lipid-Membranen eingelagert wird. Die Schutzwirkung von Vitamin E beruht auf seiner hohen Affinität gegenüber Peroxidradikalen. In den folgenden Abschnitten soll der Mechanismus der Schutzfunktion näher erläutert werden.

In der pflanzlichen Zelle werden während der Photosynthese aktive Sauerstoffspezies gebildet, wie z. B. $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, HO_2^{\bullet} und $^{\bullet}\text{OH}$. Diese Moleküle sind sehr reaktiv und bilden mit oxidierbaren Biomolekülen leicht Peroxide bzw. Ketone (Logani und Davies 1980; Asada und Takahashi 1987). Der Hauptschaden, der von den aktiven Sauerstoffspezies ausgeht, besteht darin, daß er mit Acyl-Ketten polyungesättigter Fettsäuren (PUFAs) in Membranlipiden reagiert und somit eine autokatalytische Kettenreaktion der Lipidoxidation auslösen kann. Diese Reaktion wird durch die Anwesenheit von Eisenionen in Spuren noch verstärkt (Logani und Davies 1980). Um die reaktiven Sauerstoffspezies zu entgiften, besitzt die Pflanze eine Reihe von enzymatischen (z.B. Superoxid-Dismutase und Ascorbatperoxidase) und nicht enzymati-

schen (niedermolekulare Antioxidantien wie Tocopherole, Flavonoide und Phenolische Verbindungen) Abwehrmechanismen (Larson 1988).

Bei den Tocopherolen handelt es sich um niedermolekulare Antioxidantien, die in der Lage sind, Singulett-Sauerstoff direkt aus der Membrenumgebung zu entfernen, indem sie als Radikalfänger fungieren. Die Tocopherole binden den Sauerstoff und werden so irreversibel oxidiert. Dieser Prozeß wurde von Nishikimi et al. (1980) und Fukuzawa und Gebicki (1983) *in vitro* an Mizellen- und Liposomen-Systemen gezeigt. Der hypothetische Mechanismus ist in Abbildung 1-2 dargestellt. Obwohl es außer Frage steht, daß Singulett-Sauerstoff entfernt wird, ist das Ausmaß der Entgiftung der aktiven Sauerstoffspezies durch Tocopherole nach dem beschriebenen Mechanismus in Membranen *in vivo* nicht bekannt.

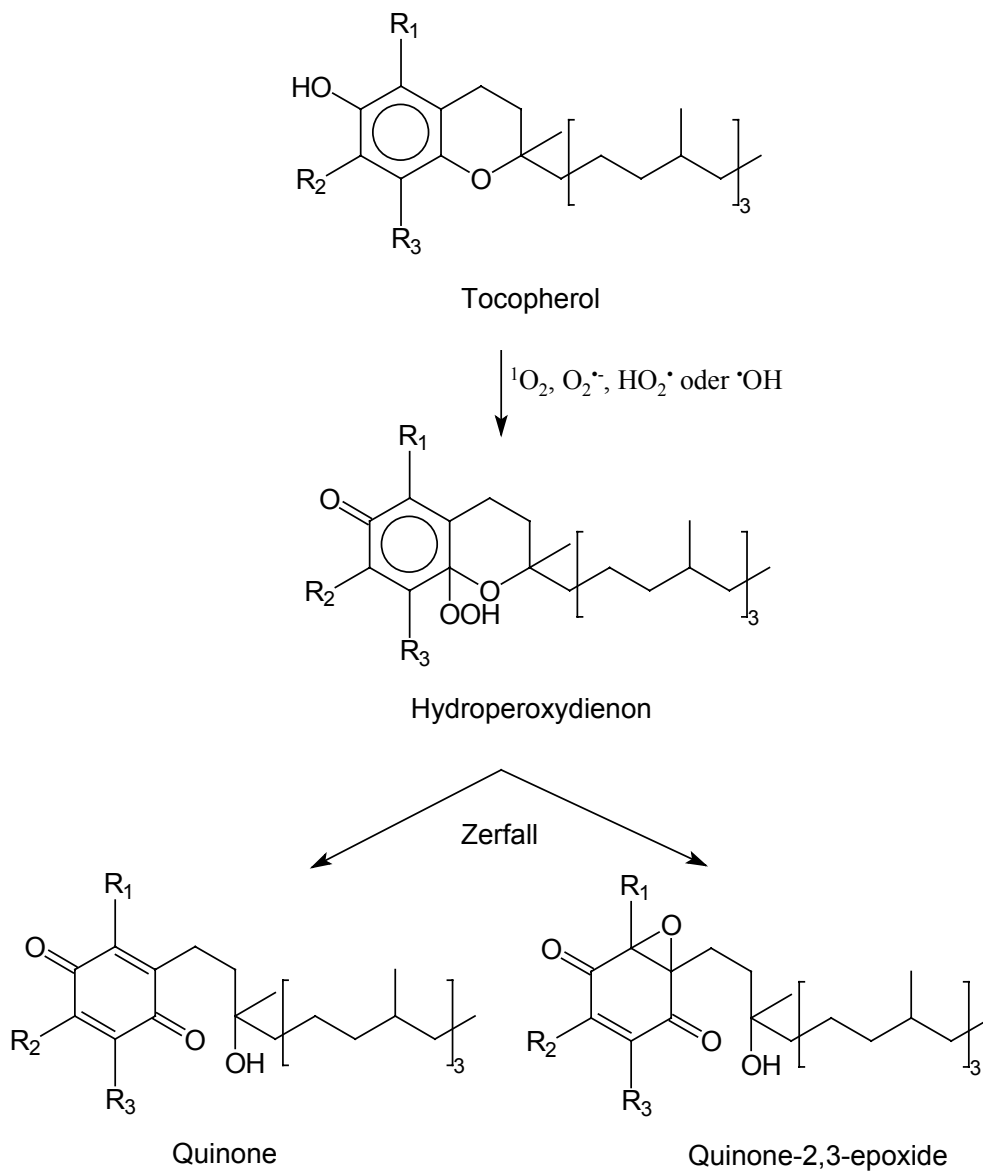


Abbildung 1-2: Mechanismus der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies durch α -Tocopherol (nach Fryer 1992).

Wie schon erwähnt, lösen reaktive Sauerstoffspezies die Autokatalyse der Lipidoxidation aus, wenn sie nicht direkt entgiftet werden. Polyungesättigte Fettsäuren unterliegen sehr schnell der Photooxidation. Da Membranen einen sehr hohen Anteil an diesen PUFA-Resten wie Linolensäure und Arachidonsäure besitzen, sind sie sehr anfällig. Die Mehrzahl der in der Literatur getroffenen Aussagen stimmten darin überein, daß α -Tocopherol in allen biologischen Membranen als ein hoch wirksamer wiederverwendbarer Radikalfänger für die Oxidationsprodukte von PUFA fungiert. Ein vorstellbarer Mechanismus ist in Abbildung 1-3 dargestellt. PUFA-Radikale werden durch die Übertragung eines Wasserstoffatoms von der Chromanol-Hydroxylgruppe des α -Tocopherols unter Bildung des α -Chromanoxyl-Radikals (auch „Tocopherol-Radikal“ genannt) reduziert (Fukuzawa et al. 1981, 1982; Niki et al. 1982; Scarpa et al. 1984). Die Radikale vom Vitamin E werden durch die direkte Wechselwirkung an der Membran-Cytosol-Oberfläche mit Vitamin C (Packer et al. 1979; Leung et al. 1981; Niki et al. 1984; Scarpa et al. 1984; Liebler et al. 1986) oder mit reduziertem Glutathion (GSH) (Niki et al. 1982; Liebler et al. 1986; Wefers und Sies 1988) reduziert. Das Glutathion- bzw. Ascorbat-Radikal wird seinerseits durch NADH oder NADPH regeneriert (Asada und Takahashi 1987). Die Antioxidantienwirkung der Tocopherole gegen die Lipidoxidation nimmt in der Reihenfolge $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ ab (Fukuzawa et al. 1982; Matsuo und Matsumoto 1983; Niki et al. 1986).

Ein anderer Fakt, der nicht außer Acht gelassen werden sollte, sind die Quervernetzungen, die Endprodukte der PUFA-Oxidation wie das Malondialdehyd in Proteinen verursachen können. Die Folgen der Radikalbildung in den Proteinen sind Di- und Polymerisationen. Eine weitere Funktion des Vitamin E könnte darin liegen, Radikale von hydrophoben Aminosäureresten, wie sie während der Lipidoxidation in den intrinsischen Membranproteinen gebildet werden, zu reduzieren (Bisby et al. 1984). Das „Recycling“ des α -Tocopherols erfolgt wie oben beschrieben.

In den letzten Jahren hat natürliches Vitamin E aufgrund seiner Wirkung als effizientes Antioxidationsmittel industriell an Bedeutung gewonnen. Vitamin E wird der menschlichen Nahrung und Kosmetika zugesetzt und dient als Stabilisator von tocopherolarmen bzw. -freien Fetten. Da Vitamin E in reiner Form als RRR- α -Tocopherol zu industrierelevanten Preisen nur von photosynthetisch aktiven Organismen produziert werden kann, ist es von industriellem Nutzen, einen Weg zu finden, natürliches Vitamin E in Pflanzen anzureichern.

In tierischen Zellmembranen spielt α -Tocopherol eine essentielle Rolle beim Schutz gegen eine Reihe von schweren Krankheiten, die durch Licht induziert werden (Hirai et al.

1985; Kagan et al. 1981). Weiterhin wird Vitamin E in der Medizin gegen Krankheiten wie z.B. AIDS (Suzuki und Packer 1993; Wang und Watson 1994; Periquet et al. 1995; Miguezburbanco et al. 1995; Buck und Chojkier 1996; Tang et al. 1997), Krebs (Comstock et al. 1997; Thompson et al. 1997; Albanes et al. 1997), Parkinson (Nakao et al. 1994) und Alzheimer (Hirai et al. 1990; Sano et al. 1996) angewendet.

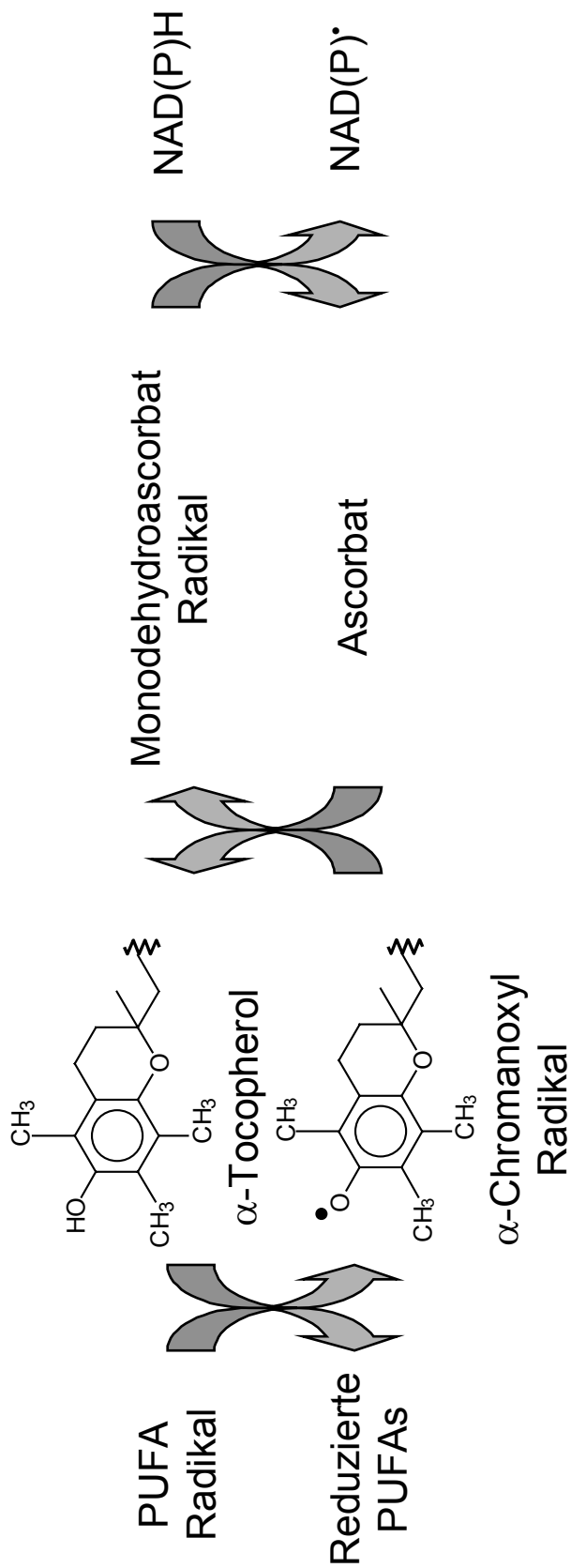


Abbildung 1-3: Mechanismus zum Schutz polyungesättigte Fettsäuren (PUFAs) gegen Oxidation (nach Fryer 1992)

1.2 Tocopherolbiosynthese

Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese der Tocopherole, verwandter Polyprenylchromanole und ihrer acyclischen Vorläufer sind im Wesentlichen von den Arbeitsgruppen Threlfall, Schultz und Pennock an intakten Pflanzenzellen, an isolierten Chloroplasten sowie an photoautotrophen Mikroorganismen durchgeführt worden. Die experimentellen Resultate zeigen einheitlich, daß Homogentisinsäure und Phytylpyrophosphat biosynthetische Vorläufer der Tocopherole sind (Abbildung 1-4). Einbauversuche von [2-¹⁴C]-Homogentisinsäure in verschiedene Organismen (höhere Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien) ergaben unter anderem radioaktives Plastohydrochinon-9, γ - und α -Tocopherol (Whistance und Threlfall 1968, 1970; Schultz 1985; Henry et al. 1987).

Threlfall und Mitarbeiter untersuchten 1985 die Methylierung des Monomethylphytylhydrochinons in Salat- und Spinat-Chloroplasten durch Inkubation mit [Methyl-¹⁴C]-SAM, [2-³H]-Homogentisinsäure und Isopentylpyrophosphat. Die Autoren bestätigten mit einer fortgeschrittenen Analytik die früheren Resultate von Soll und Schulz (1980), wonach das 2,3-Dimethyl-5-phytylhydrochinon (bzw. das entsprechende Chinon) das einzige acyclische Methylierungsprodukt von 2-Methyl-6-phytylhydrochinon ist. Daneben wurden radioaktives γ - und α -Tocopherol mit Inkorporationsraten von 0,3 bzw. 0,08% nachgewiesen.

Pennock und Mitarbeiter (1987) zeigten, daß sämtliche Isomere der monomethylierten Phytylhydrochinone in der Grünalge *Scenedesmus obliquus* vorkommen und daß α -Tocopherol hauptsächlich in den Chloroplasten, β -, γ - und δ -Tocopherol aber mehr im Cytosol nachweisbar sind. Aufgrund dieser Untersuchungen stellte sich die Frage nach einer Kompartimentierung der Tocopherol-Biosynthese. In diesem Zusammenhang haben Schultz und Mitarbeiter 1985 einen wichtigen Beitrag geleistet. Nach Dichtegradientenzentrifugation von Chloroplastenmembranen aus Spinat wurden die inneren und äußeren Hüllmembranen getrennt und auf ihre Synthesekapazität für Tocopherole untersucht. Es zeigte sich, daß die äußere Hüllmembran 50% mehr α -Tocopherol enthielt als die innere Hüllmembran, daß aber die Enzymaktivitäten zur Synthese von 2-Methyl-6-phytylhydrochinon aus Homogentisinsäure und Phytylpyrophosphat sowie zur Methylierung von 2-Methyl-6-phytylhydrochinon und von γ -Tocopherol in der inneren Hüllmembran angereichert waren. Die Zyklisierung von 2,3-Dimethyl-5-phytylhydrochinon zu γ -Tocopherol konnte jedoch mit keiner der beiden Membranfraktionen nachgewiesen werden, was dazu führte, in dieser Reaktion

einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Tocopherolsynthese zu vermuten (Soll et. al 1985).

Auch die geringen Syntheseraten von α -Tocopherol, die Camara und Mitarbeiter (1982) durch Inkubation von Chromoplasten-Membranen aus roten Paprikaschoten mit [Methyl- ^{14}C]-SAM und unmarkiertem 2,3-Dimethyl-5-phytylhydrochinon messen konnten, sind vermutlich nur auf die Akkumulation von Vorstufen der Tocopherolbiosynthese zurückzuführen, wie Arango und Heise (1998) an Chromoplastenmembranen aus Paprikaschoten einer gelben Varietät zeigen konnten. Die gleichen Autoren konnten durch Inkubation der Membranen mit [^3H]-Homogentisinsäure und Phytylpyrophosphat die vollständige Biosynthese der Tocopherole (Abbildung 1-4) simulieren, wenn die Homogentisinsäure direkt im Ansatz reduziert wurde. Eine Ratenlimitierung der α -Tocopherolbiosynthese durch die Chromanringbildung (Cyclasereaktion) wurde dagegen aufgehoben, wenn der leicht oxidierbare Chromanolrest reduziert (Hydrochinonform) und die hydrophobe Seitenkette (Phytylrest) des Vorläufers in eine wasserlösliche Form gebracht wurde. So gelang es der Arbeitsgruppe Stocker 1992 erstmalig, hohe Aktivitäten der Tocopherol-Cyclase (γ -Tocopherolbildung) in Inkubationsansätzen von Spheroplasten aus *Anabaena variabilis* (Cyanobakterien) nachzuweisen, in denen sie die hydrophobe Vorstufe (2,3-Dimethyl-5-phytylhydrochinon) mit 2,6-Di-O-methyl- β -Cyclodextrin maskierten und mit Ascorbat im reduzierten Zustand hielten. Die Cyclase wurde anschließend von der gleichen Arbeitsgruppe isoliert (Stocker et al. 1994) und auf Substratspezifitäten und Reaktionsmechanismus hin untersucht (Stocker et al. 1996).

Camara und d'Harlingue isolierten die γ -Tocopherolmethyltransferase bereits 1985 aus *Capsicum annuum*-Chromoplasten. Die Reinigung umfaßte fünf Stufen und führte zu einer 65-fachen Anreicherung. Anschließend wurde die Reinheit im Gel durch eine Proteinbande bei ca. 33 kDa gezeigt. Im Jahre 1992 untersuchte die Arbeitsgruppe von Mitsunaga das gleiche Enzym nacheinander in Chloroplastenmembranen aus Spinat und in Zellhomogenaten aus *Euglena gracilis*. Es gelang aber nicht, das Enzym bis zur vollständigen Homogenität zu reinigen. Das native Molekulargewicht der γ -Tocopherolmethyltransferase wurde von beiden Arbeitsgruppen auf etwa 150 kDa geschätzt, woraus man schloß, daß sie als Aggregat vorlag. Proteinsequenzen von den gereinigten Enzymen liegen jedoch nicht vor, womit auch die Reinheit nicht direkt bewiesen wurde.

DellaPenna und Mitarbeiter untersuchten 1998 den Biosyntheseweg von α -Tocopherol mit molekularbiologischen Methoden und lieferten die Proteinsequenz (abgeleitet von der DNA-Sequenz) für die γ -Tocopherolmethyltransferase von *Synechocystis* und *Arabidopsis*.

Dieses Enzym zeigte hohe Homologien zu einer Δ -(24)-Sterol-C-Methyltransferase bei Pflanzen.

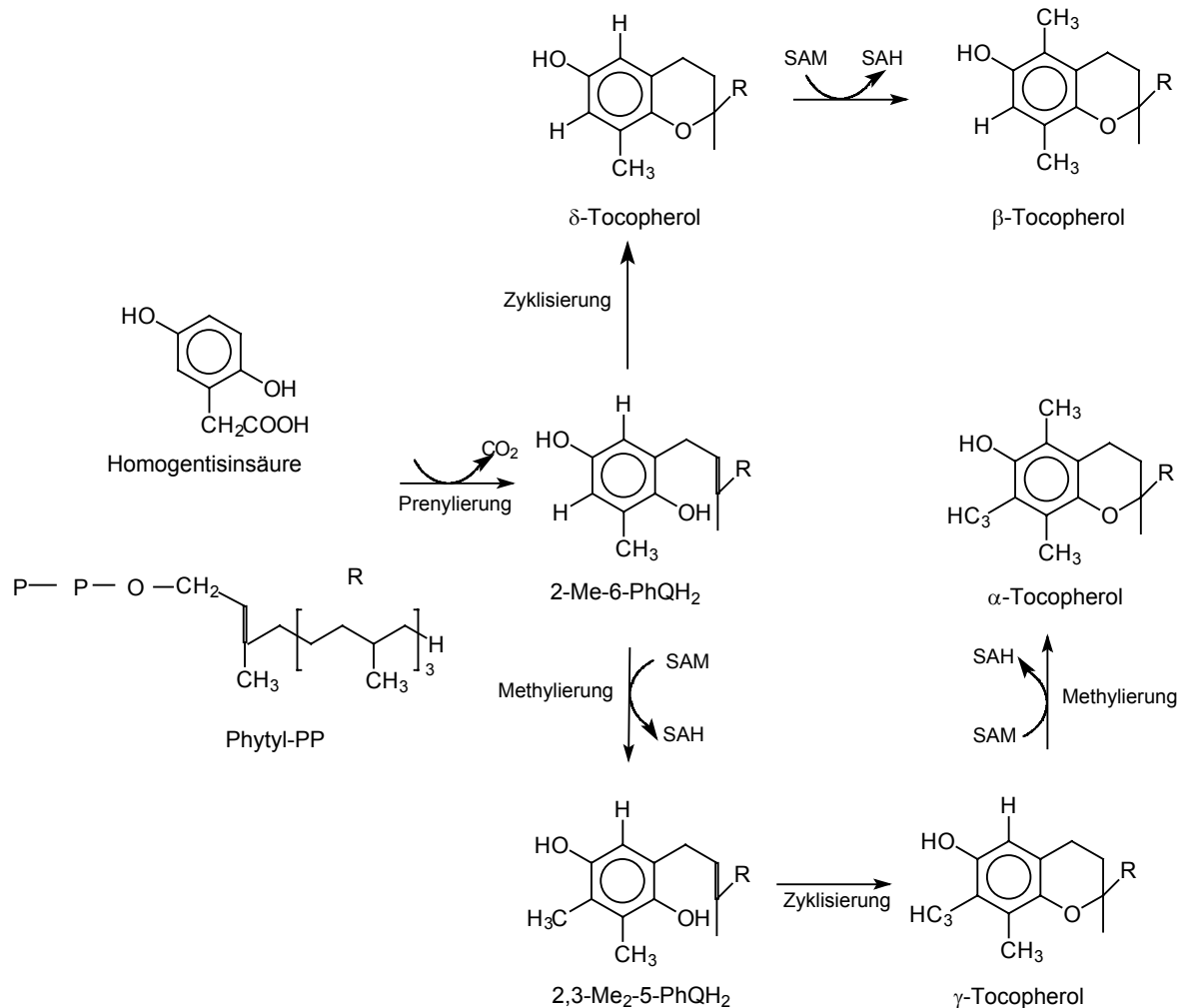


Abbildung 1-4: Tocopherolbiosynthese ausgehend von Homogentisinsäure und Phytolpyrophosphat.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, gewinnen die Tocopherole zunehmend an industrieller Bedeutung durch ihre Eigenschaft als lipidlösliche Antioxidantien. Da die technisch hergestellte Mischung aus acht Stereoisomeren sich von den natürlichen Tocopherolen, welche drei chirale Zentren mit R-Konfiguration besitzen, wesentlich in ihrer biologischen Wirkung unterscheidet, ist das Interesse der Industrie an der Gewinnung von natürlichem Vitamin E gestiegen. Von Interesse sind natürliche Tocopherole wie z. B. α - und γ -Tocopherol, denen unterschiedliche Wirkmechanismen im Stoffwechsel zugeschrieben werden.

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit bestand darin, die γ -Tocopherolmethyltransferase, welche die Synthese von α -Tocopherol aus γ -Tocopherol und SAM katalysiert, zu isolieren. Anschließend sollte die Proteinsequenz ermittelt und mittels molekularbiologischer Methoden das Enzym in *E. coli* oder Hefe produziert werden. Das im heterologen System produzierte Enzym sollte eingehend auf seine Substratspezifität und seinen Reaktionsmechanismus hin untersucht werden.

Anhand des von Camara (1985) publizierten Protokolls wurde die Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Capsicum annuum* nachvollzogen. Da es anhand des publizierten Protokolls nicht möglich war, das Enzym bis zur vollständigen Homogenität zu reinigen, wurde Schritt für Schritt ein neues Reinigungsprotokoll entwickelt. Die Reinigung wurde auch nach der Veröffentlichung der Sequenzdaten für die γ -Tocopherolmethyltransferase von *Synechocystis und Arabidopsis thaliana* (DellaPenna et al. 1998) weiterverfolgt, da dieses Enzym eine hohe Homologie zur pflanzlichen Δ -(24)-Sterol-C-Methyltransferase aufwies. Weiterhin lag die Vermutung nahe, daß in *Capsicum* ein Enzym mit einer anderen Proteinsequenz für die γ -Tocopherolmethyltransferase-Aktivität verantwortlich sein könnte und daß in *Capsicum* Isoformen dieses Enzyms existieren.

Da keine Reinigung bis zur vollständigen Homogenität möglich und absehbar war, daß auch eine weitere Optimierung der Reinigung zu keinem befriedigenderen Ergebnis geführt hätte, sollte das partiell gereinigte Enzym aus *Capsicum annuum* charakterisiert werden. Außerdem sollte eine kinetische Charakterisierung des rekombinanten Enzyms aus *Arabidopsis thaliana*, welche über die von DellaPenna beschriebene Proteinsequenz zugänglich war, durchgeführt werden. Anschließend sollten die gemessenen Eigenschaften der beiden Enzyme miteinander verglichen werden.

Weiterhin sollte mit Hilfe des rekombinanten Enzyms aus *Arabidopsis thaliana* die Fragestellung untersucht werden, welcher Reaktionsmechanismus bei der durch die γ -Tocopherolmethyltransferase vermittelten Zwei-Substrat-Reaktion vorliegt.

Um über die Regulation der α -Tocopherolbiosynthese in der Pflanze eine Aussage treffen zu können, wurden von der Firma SunGene (Dr. Ebnet) Antisense-Pflanzen gegen die γ -Tocopherolmethyltransferase zur Verfügung gestellt. Diese Pflanzen sollten auf ihren Tocopherolgehalt und ihre Tocopherolverteilung hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Paprika

Für die vorliegenden Experimente wurden Früchte von *Capsicum annuum* L. verwendet, welche auf dem Markt käuflich erworben bzw. im Gewächshaus angezogen wurden.

Die roten Früchte für die Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase wurden käuflich auf dem Markt erworben. Tabelle 2-1 zeigt eine Aufstellung der verwendeten Sorten. Die Sorte variierte je nach Jahreszeit und Herkunftsland.

Jahreszeit	Herkunftsland
November, Dezember	Kalifornien (Sorte: ROJO)
Januar, Februar, März, Mai, September, Oktober	Spanien (Sorte: Grand und Kalieber G)
Juni, Juli, August	Holland

Tabelle 2-1: Aufstellung der Paprika-Sorten für die Reinigung

2.1.2 Anzucht der Grünalgen

Die untersuchten Algen wurden von der Algensammlung der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

2.1.2.1 Grünalge - *Chlamydomonas reinhardtii*

2-3 ml einer Stammkultur von *Chlamydomonas reinhardtii* 11-32 wurden in Kulturröhren mit 300 ml steriler Kuhl-Lösung (Kuhl 1994) gegeben und bei 20°C unter autotrophen Bedingungen (bei einer Lichtintensität von etwa $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ an der Oberfläche der Kulturröhren) kultiviert. Die Kulturen wurden in Luftgemischen mit 5% CO₂ angezogen und erreichten nach 5-7 Tagen eine optische Dichte von 3,0 bei 680 nm.

2.1.2.2 Grünalge - *Chlorella sorottiana*

Die Anzucht von *Chlorella sorottiana* 211-8K wurde, wie für *Chlamydomonas reinhardtii* unter 2.1.2.1 beschrieben, durchgeführt.

2.1.2.3 Grünalge - *Dunaliella bioculata*

Die Zellen der Stammkultur von *Dunaliella bioculata* SAG 19-4 wurden in 300 ml Kulturröhren im Lichtthermostaten (KNIESE, Marburg) unter konstanter Beleuchtung ($20 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) und Begasung (Luft angereichert mit 2% CO_2) bei 25°C angezogen. Das verwendete Kuhl-Medium (Kuhl 1962) enthielt zusätzlich 0,1 bzw. 1 M NaCl.

<i>Dunaliella</i> Medium:	5 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7
	0,5 M	NaCl
	10 mM	KNO_3
	1 mM	MgSO_4
	11 μM	CaCl_2
	1 μM	H_3BO_3
	1 μM	MnSO_4
	1 μM	ZnSO_4
	10 nM	CuSO_4
	10 nM	$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$
	2,5 nM	$\text{FeSO}_4 / \text{EDTA}$ Komplex

2.1.3 Transformierte *E.coli*-Kulturen

Der γ -TMT Klon wurde von der Firma SunGene zu Verfügung gestellt. Herr Dr. Badur transformierte *E.coli* mit einem Expressionskonstrukt, welches die volllängen cDNA von Arabidopsis enthielt. Die Expressionsstudien wurden unter Verwendung des pQE30-Vektors durchgeführt.

2.1.4 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die *Arabidopsis* Pflanzen für die Tocopherol Untersuchungen wurden von der Firma SunGene angezogen. Nach der Ausbildung der vollen Rosetten (ca. 6 Wochen) wurden die Pflanzen geerntet und die Rosettenblätter der Tocopherolanalyse unterworfen.

2.2 Bestimmung der Tocopherole mittels HPLC

2.2.1 Aufarbeitung, Lyophilisierung und Trockengewichtsbestimmung

Das Paprikaperikarp wurde zerkleinert und in einem vorgekühlten Mörser unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben. So wie das Paprikaperikarp wurden auch die Pflanzensamen, Blätter, Blütenblätter und Früchte behandelt, welche auf ihren Tocopherolgehalt mittels HPLC untersucht werden sollten. Die Algen wurden abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das Trockengewicht des Pulvers der Pflanzenteile bzw. der gefrorenen Algen wurde nach Lyophilisation (-20°C , eine Woche) ermittelt.

2.2.2 Isooctan – Extraktion

Diese Extraktionsmethode wurde bei allen untersuchten Spezies mit Ausnahme der Algen verwendet.

Etwa 50 mg lyophilisiertes Pulver wurden mit 1 ml Isooctan 30 min unter ständigem Schütteln extrahiert. Anschließend wurde 10 Minuten bei $15800 \times g$ (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Watte filtriert.

2.2.3 n-Hexan – Isopropanol – Extraktion für Grünalgen

30 mg lyophilisiertes Algenpulver wurden zunächst 2 Minuten mit n-Hexan:Isopropanol (2:1; v/v) geschüttelt, dann 10 min mit Ultraschall behandelt und 1 Minute geschüttelt, anschließend mit $600 \mu\text{l}$ 0,9 % NaCl 1 Minute lang ausgeschüttelt und 10 Minuten bei $15800 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment noch zweimal mit $800 \mu\text{l}$ n-Hexan:Isopropanol (2:1; v/v) ausgeschüttelt. Die vereinigten Überstände wurden unter Stickstoff eingengt und die Rückstände in 1 ml Isooctan resuspendiert und über Watte filtriert.

2.2.4 HPLC – Messung

Die Messung der Tocopherole wurden in Anlehnung an die Methode von Thies (1997) durchgeführt. Die Tocopherole wurden nach Trennung an einer Normalphase mittels Fluores-

zenz-Detektor gemessen. Die Detektion mittels Fluoreszenz erlaubt eine fast 100%ige Erfassung des Tocopherols (Thies 1997).

Der HPLC-Aufbau und die HPLC-Bedingungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

HPLC-Pumpe:	Pharamazia-LKB; HPLC-Pump 2248 Flußrate: 0,7 ml / min (Druck: 8,5 MPa)
Detektor:	Dionex Fluoreszenz Detector Anregung: 295nm Emission: 320nm Empfindlichkeit: Response: 0,1 Range: 1
Vorsäule:	5 x 4 mm i.Ø LiChrospher Si 60, 5 µm
Trennsäule:	250 x 30 mm i.Ø LiChrospher 100 Diol, 5 µm
Laufmittel:	Isooctan : tert. Butylmethylether (94 : 6, v/v)
Dauer des Laufes:	40 Minuten

Tabelle 2-2: HPLC-Aufbau und HPLC-Bedingungen

Die Eichung des Gerätes und die Ermittlung der Responsefaktoren erfolgte mit einem Tocopherolgemisch aus α -, β -, γ - und δ -Tocopherol der Firma Merck.

Responsefaktoren:	α -Tocopherol	0,849
	β -Tocopherol	0,822
	γ -Tocopherol	1,312
	δ -Tocopherol	1

100 µl Isooctanextrakt aus Paprika wurden mit einem internen Standard (4 ng/µl) versetzt. Als interne Standards wurden verwendet:

δ -Tocopherol	für Paprika, da δ -Tocopherol kaum vorkommt
β -Tocopherol	für Algen, da γ -, δ - bzw. β -Tocopherol nicht meßbar waren

Die Tocopherolkonzentrationen wurden mittels folgender Formel errechnet:

$$\text{Konzentration}_{\text{Tocopherol}} [\mu\text{g} / \text{g}] = \frac{\text{Fläche} * \text{Responsfaktor} * \text{Konzentration}_{\text{Standard}} [\mu\text{g} / \mu\text{l}]}{\text{Fläche}_{\text{Standard}} * \frac{\text{Einwaage} [\text{g}]}{\text{Extraktionsvolumen} [\mu\text{l}]}}$$

2.3 Lipidanalyse

3 g Fruchtperikarp von *Capsicum annuum* wurden unter flüssigem Stickstoff zerrieben und mit 50 ml Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) extrahiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment nochmals mit 10 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches reextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden anschließend mit dem gleichen Volumen an 6,7%iger Na₂SO₄-Lösung ausgeschüttelt. Die Hexan-Phase wurde abgenommen und die wäßrige Phase nochmals mit 5 ml Hexan gewaschen. Die Hexan-Phasen wurden vereint, in der Vakuumzentrifuge eingengt und in 1 ml Chloroform aufgenommen.

Der Extrakt wurde auf eine Kieselgelsäule (1g Säulenmaterial in Chloroform) aufgetragen. Die Lipide wurden stufenweise mit folgenden Lösungsmitteln eluiert: a) Neutralfette (Di-, Triglyceride und freie Fettsäuren) und Pigmente mit 12 ml Chloroform; b) Glykolipide und polarere Carotinoide nacheinander mit 20 ml Aceton und 20 ml Aceton:Essigsäure (99:1 v/v) und c) Phospholipide mit 12 ml Methanol.

Zur gaschromatographischen Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung (Sauer und Heise 1983; Aach und Heise 1998) wurden die Lipideluate sauer methanolysiert. Dazu wurde ein Aliquot der Lipideluate mit 27 mg/ml Heptadecansäurelösung in Chloroform als „Internem Standard“ versetzt und in Schraubdeckelgläsern mit 4 ml einer Mischung aus Methanol/Schwefelsäure/Toluol (20:1:1, v/v/v) 45 Minuten bei 75°C sauer methanolysiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 4 ml Wasser wurden die Fettsäuremethylester dreimal mit je 1 ml Heptan ausgeschüttelt und die Heptanphasen vereint. Der Heptanextrakt wurde anschließend gaschromatographisch untersucht.

2.4 Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase (γ -TMT) aus *Capsicum annuum*

2.4.1 Isolierung von Chromoplasten aus Paprika

Die Chromoplasten wurden nach einer durch Arango und Heise (1997) modifizierten Methode von Camara (1985) isoliert.

Das Perikarp von 12 kg frischen Paprikafrüchten wurde zunächst mit einem Messer in Stücke geschnitten und anschließend in 21 l Isolationsmedium mit einem „Waring Blendor“ homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Nylon-Siebgewebe (50 μ m Porendurchmesser) filtriert und 10 Minuten bei 2000 x g (Sorvall, GS3) zentrifugiert. Das Sediment wurde noch zweimal mit Isolationsmedium gewaschen und 5 Minuten bei 2000 x g (Sorvall, SS34) sedimentiert.

Das Isolationsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Tris-HCl (pH 8)	50 mM
Saccharose	0,4 M
EDTA	1 mM
2-Mercaptoethanol	1 mM

2.4.2 Messung der α -Tocopherol-Synthese

α -Tocopherol wird aus γ -Tocopherol in einer Methylierungsreaktion mit SAM als CH_3 -Donor gebildet (Soll et al. 1985). Durch das im Versuchansatz verwendete [^{14}C]-SAM wird es möglich, die α -Tocopherol-Bildung durch die [^{14}C]-Markierung zu messen.

Der Testansatz (500 μ l) war wie folgt zusammengesetzt:

Tricin-NaOH (pH 7,6)	50 mM
Sorbitol	0,25 M
MgCl_2	1 mM
Adenosyl-L-Methionin, S-[Methyl- ^{14}C]	14 μ M (1,85 Gbq/mmol, Amersham Pharmacia)
γ -Tocopherol (in Ethanol)	100 μ M

Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von 0,1-0,7 mg Protein. Nach 2,5 Stunden Inkubation der Probe bei 25°C im Dunkeln wurde die Reaktion durch die Zugabe von 750 μ l

Chloroform/Methanol (1:2 v/v) gestoppt. Anschließend wurde mit 750 μ l 0,9%iger NaCl-Lösung ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde verworfen, die organische wurde unter Stickstoff abgedampft und die Rückstände in 20 μ l Diethylether resuspendiert. Anschließend wurde α -Tocopherol als interner Standard für die dünnschichtchromatographische Analyse zugesetzt. Die Trennung erfolgte auf Kieselgel-Platten (HPTLC-Kieselgel 60 F₂₅₄; Firma Merck) mit Toluol als Laufmittel. Die Tocopherolflecken wurden unter UV-Licht (254 nm) lokalisiert. Das radioaktiv markierte Produkt wurde mit dem PhosphorImager (Storm; Molekular Dynamic) detektiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm „Image Quant 5.0“ (Molekular Dynamic) unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von [¹⁴C]-SAM.

2.4.3 Messung der 2,3-Dimethylphytylhydrochinon- und γ -Tocopherol-Synthese

Der Enzymtest für die α -Tocopherol-Synthese beruht auf der Methylierung von 2-Methylphytylhydrochinon, der anschließenden Zyklisierung von 2,3-Dimethylphytylhydrochinon und der Methylierung von γ -Tocopherol in Anwesenheit von S-Adenosyl-L-methionin (Soll et al. 1985; Camara et al. 1982).

Die Cyclaseaktivität wurde nach einer modifizierten Methode von Stocker (1992) und Camara (1982) bestimmt. Als Meßgröße diente α -Tocopherol. Mit dem Test sollte nur untersucht werden, ob sich die Aktivitäten von Methyltransferase und Cyclase trennen lassen. Der Testansatz war wie unter 2.4.2 zusammengesetzt mit der Einschränkung, daß statt γ -Tocopherol 2,3-Dimethylphytylhydrochinon eingesetzt wurde. Die 2,3-Dimethylphytylhydrochinon-Stammlösung wurde, wie von Stocker 1992 beschrieben, wie folgt hergestellt: 2,3-Dimethylphytylhydrochinon und 2,6-Di-O-methyl- β -Cyclodextrin wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 gemischt. Nach der Zugabe von 4 ml Puffer, bestehend aus 30 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 500 mM Saccharose, 4 mM MgSO₄ x 7 H₂O und 175 μ M EDTA, wurde die Lösung vorsichtig bei 4°C für ca. 5 Minuten geschwenkt. Nach der Bildung des Einschlußkomplexes wurde der zitronengelben Lösung 2,5 mmol Ascorbinsäure zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung so verdünnt, daß eine Lösung mit 100 μ M 2,3-Dimethylphytylhydrochinon entstand. Nach Lagerung für 3 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend für 1 Stunde bei 4°C wurde die glasklare Lösung im Testansatz eingesetzt.

Die Methode zur Messung der 2-Methylphytylhydrochinon-Methyltransferase wurde aus dem γ -Tocopherolmethyltransferase-Test entwickelt. Der Testansatz enthielt statt γ -Tocopherol 2-Methylphytylhydrochinon als Substrat. Dem Ansatz wurden zusätzlich noch 10 mM Ascorbinsäure und 30 μ M S-Adenosyl-L-methionin zugesetzt. Die Messung erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben.

2.4.4 Herstellung des Acetonpulvers

Das Acetonpulver wurde nach einer modifizierten Methode von Camara (1985) hergestellt.

Das Chromoplastensediment aus 20 kg Paprikaperikap (2.4.1) wurde in 400 ml Acetonfällungsmedium aufgenommen. Die Chromoplastenproteine wurden mit 4 l eiskaltem Aceton über Nacht bei -20°C gefällt und 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde viermal mit Aceton (-20°C) bei 9000 x g (Sorvall) gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in Ether resuspendiert, auf einer Fritte getrocknet und nach Pulverisierung für 30 min unter Vakuum getrocknet. Anschließend erfolgte eine Gewichtsbestimmung des Acetonpulvers.

Das Acetonfällungsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Tris-HCl (pH 8)	50 mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	1 mM
DTT	10 mM

2.4.5 Solubilisierung und (NH₄)₂SO₄ – Fällung der γ -Tocopherolmethyltransferase

Das erhaltene Pulver wurde mit einem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 mit 5 mM DTT und 1 mg/ml Tween 80 (20 ml Puffer pro 1 g Pulver), 30 Minuten auf Eis in einem Hand-Potter extrahiert und danach 1h bei 100000 x g zentrifugiert.

Die Proteine wurden anschließend mit Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) gefällt. Dazu wurde das zuvor gewonnene Solubilisat mit (NH₄)₂SO₄ bis zu einer Sättigung von 20% gefällt. Der durch anschließende Zentrifugation (10 Minuten, 27000 x g, 4°C) gewonnene Überstand wurde mit (NH₄)₂SO₄ bis zu einer Sättigung von 50% gefällt. Die Fraktion von 50% (NH₄)₂SO₄-Sättigung wurde durch Sedimentation (10 Minuten, 27000xg, 4°C) gewonnen und in 25 ml 0,1 M Kaliumphosphat (pH 8) mit 1 mM DTT und 1 mM EDTA resuspendiert. In

diesem Puffer konnte das Enzym bei -20°C bis zu 4 Tage ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Vor der weiteren Verwendung wurde die Enzymlösung mittels einer Sephadex G25 Säule entsalzt und umgepuffert.

2.4.6 Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde ein FPLC-System der Firma Pharmazia Biotech verwendet.

Das System bestand aus folgenden Einzelbausteinen:

Kontrolleinheit	LCC-501 Plus FPLC-Controller
Pumpe	High Precision Pump P-500 (2 Stück)
UV-Detektor	UV-M II
Schreiber	Recorder REC-112 dual channel
Fraktionssammler	FRAC 200 Fraction Collector

2.4.6.1 Verwendete Puffersysteme

Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,2
1 mM EDTA
3 mM DTT
2 % Glycerin (v/v)

Puffer A1: A + 1 M NaCl

Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,8
1 mM EDTA
3 mM DTT
5 % Glycerin (v/v)

Puffer B1: B + 1 M NaCl

Puffer C:	10 mM Kaliumphosphat pH 7,3 3 mM DTT 5 % Glycerin (v/v)
Puffer D:	400 mM Kaliumphosphat pH 7,3 3 mM DTT 5 % Glycerin (v/v)
Puffer E:	25 mM Tris/HCl pH 7,6 1 mM EDTA 3 mM DTT 5 % Glycerin (v/v)
Puffer E1:	E + 2 M NaCl
Puffer F:	0,1 M Kaliumphosphat pH 7 1 mM EDTA 3 mM DTT
Puffer G:	20 mM Kaliumphosphat pH 5,6 6 M Guanidinhydrochlorid

2.4.6.2 Anionenaustauscher-Chromatographie (2,6 cm x 30 cm, DEAE – Sepharose Fast Flow)

Die Proteine wurden auf eine DEAE-Sepharose-Säule im Puffer A geladen. Die Trennung erfolgte mittels eines Gradienten (0 min: 100% A, 60 min: 20% A1, 95 min: 50% A1, 110 min: 100% A1, Flußrate von 4 ml/min). 10 ml Fraktionen wurden aufgefangen. Die Fraktionen mit der höchsten Gesamtaktivität wurden vereinigt und über Nacht dialysiert gegen den Puffer B.

2.4.6.3 Anionenaustauscher-Rechromatographie (1,6 cm x 12 cm, DEAE – Sepharose Fast Flow)

Für die Anionenaustauscher – Rechromatographie wurde eine 25 ml Säule bei einem veränderten pH-Wert (pH 7,8) verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min. Die Fraktionsgröße betrug 5 ml.

Die Fraktionen mit der höchsten Gesamtaktivität wurden vereinigt. Vor der Auftragung der Proteinlösung auf die Hydroxylapatit – Säule wurde mit PEG das Volumen auf die Hälfte reduziert (siehe 2.4.8) und durch den Puffer C über Sephadex G25 ausgetauscht.

2.4.6.4 Proteintrennung durch hydrophobe Wechselwirkungen (1,6 cm x 10 cm, Hydroxylapatit)

Die weitere Trennung erfolgte auf einer Hydroxylapatit – Säule (20 ml Säulenmaterial). Eluiert wurden die Proteine mittels eines Phosphat-Gradienten (0 min: 100% C, 60 min: 25% D, 85 min: 100%D) bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Fraktionen (5ml) mit der höchsten Gesamtaktivität wurden vereinigt. Anschließend wurde ein Pufferaustausch mittels Sephadex G25 vorgenommen.

2.4.6.5 Affinitätschromatographie (1,6 cm x 8 cm, Blue Sepharose Fast Flow)

Zur weiteren Reinigung wurde die Proteinlösung mit einer Flußrate von 0,5 ml/min auf eine Blue Sepharose-Säule (Fast Flow) aufgetragen (15 ml Säulenmaterial, Fraktionsgröße 5 ml) und mit einer Flußrate von 1 ml/min chromatographiert. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten (0 min: 100% E; 45 min: 10% E1, von 50 bis 110 min: 100% E1).

Die Fraktionen mit der höchsten Gesamtaktivität wurden vereint und mittels PEG konzentriert.

2.4.7 Denaturierende Gelfiltration (BioSep-SEC-S3000, HPLC gestützte Reinigung)

Bei dieser Reinigungsmethode können die denaturierten Enzyme nach ihrem Molgewicht getrennt werden. Diese Methode ist sehr bedeutend bei Enzymen, die eine geringe Lebensdauer haben und somit nicht nativ bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden können.

Die konzentrierten Fraktionen von der Blue Sepharose-Säule wurden mittels Chloroform/Methanol nach der Methode von Wessel und Flügge (1984) gefällt und in Puffer G aufgenommen.

Anschließend wurden die Proteine im Puffer G auf eine BioSep-SEC-S3000-Säule (300 x 7,8 mm) aufgetragen. Die Flußrate von 1 ml/min wurde mit einer HPLC-Pumpe (Waters 2690 Separation Modul, Alliance System) erzeugt und das Enzym wurde mittels des PDA-Detektors von Waters detektiert. Als Aufzeichnungsgerät diente ein Schreiber von BioRad.

Als Standard wurden folgende Proteine verwendet:

BSA	68 kDa
Eialbumine	45 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Myoglobine	17,8 kDa

2.4.8 Konzentrierung der Enzymlösungen

Die Enzymlösung wurde mittels einer Dialyse gegen Polyetylen glycol 35000 konzentriert. Es wurde ein Dialyseschlauch von der Firma Roth (Zellu Trans, MWCO 4000-6000) verwendet.

2.4.9 Molekulargewichtsabschätzung

2.4.9.1 Nativ: Gelfiltration (Superdex 200 HR 30/10)

Die Proteinlösung (200 µl einer Proteinlösung mit 7 ng Protein/µl) wurde mit 0,5 ml/min Puffer F auf einer Superdex 200 HR 30/10-Säule (30 cm x 1 cm, Fraktionierungsreich: 10 kDa - 600 kDa, Fraktionsgröße 1,25 ml) chromatographiert.

Als Standard wurde folgende Proteine verwendet:

Aldolase	160 kDa
BSA	68 kDa
Eialbumine	45 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Myoglobine	17,8 kDa

2.4.9.2 Denaturiert: SDS-PAGE

Die Methode wird wie unter 2.5 beschrieben durchgeführt. Zur Eichung wurde der LMW Calibration Kit von Pharmacia verwendet.

2.4.9.3 Photoaffinitäts – Markierung mit [¹⁴C]-SAM

Die Photoaffinitäts-Markierung wurde mit gereinigten Fraktionen der γ -TMT in Anlehnung an die von Subbaramaiah und Simms (1992) beschriebene Methode durchgeführt. Für den Markierungsversuch wurden die Inkubationszeiten nicht verändert, der Extrakt wurde lediglich unter einer UV-Lampe (254 nm) in 1 – 2 cm Abstand inkubiert.

2.4.10 Chromatofocussing

Das verwendete System stammt von der Firma Pharmacia Biotech und wird unter dem Namen „PolybufferTM and Polybuffer Exchangers for Chromatofocussing“ vertrieben. Während der Chromatographie bildete sich durch die Äquilibrierung mit dem Startpuffer (25 mM Imidazol, pH 7,4) und die anschließenden Elution mit „Polybuffer“ (Polybuffer 74-HCL, pH 4,0) ein pH-Gradient auf der Säule. Die Flußrate betrug 1 ml/min. 1 ml Fraktionen wurden gesammelt. Der pH-Wert und die Enzymaktivität jeder Fraktion wurde getestet.

2.5 Rekombinante γ -TMT aus Arabidopsis

2.5.1 Anzucht der transformierten *E.coli*-Kulturen

150 ml LB-Medium wurden mit Zellen einer Glycerinkultur von *E. coli* (γ -TMT Klon) angeimpft und über Nacht bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde eine 2 l Kultur (13 ml Vorkultur auf 250 ml LB-Medium) angeimpft und bei 28°C bis zu einer optischen

Dichte von 0,6 bei 600 nm angezogen. Dann erfolgte mit 0,4 mM IPTG die Induktion der Zellen, d.h. die Bildung des γ -TMT-Proteins wurde angeregt. Nach 2 Stunden Induktion wurden die Zellen geerntet. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 x g für 10 Minuten. Anschließend wurden die Zellen bis zur Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

LB (Luria Broth) – Medium: 10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

werden mit H_2O auf 1000 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert.

Nach dem Autoklavieren werden 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin und 200 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin dem Medium steril zugesetzt.

2.5.2 Lysat Präparation

(in Anlehnung an das Qiagen-Protokoll)

Die *E.coli* Zellen wurden bei 4000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen im Lysis-Puffer (2-3ml pro g Zellfrischgewicht) resuspendiert. Bevor die Zellsuspension für 30 min auf Eis inkubiert wurde, wurden der Suspension 0,4 mg/ml Lysozym zugesetzt. Der Zellaufschluß erfolgte mit Ultraschall (vier Beschallungsschritte á 15 s unterbrochen durch Kühlperioden von 30 s). Das erhaltene Lysat wurde 20 min bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Reinigung verwendet.

2.5.3 Reinigung des nativen rekombinanten Enzyms

Das rekombinante Enzym trägt einen His-tag. Dieser His-tag bindet in einer Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Nickel-Agarose.

Die Beladung der Nickel-Agarose-Säule (Quiagen Ni-NTA Superflow; 1 x 10 cm, Fraktionsgröße 10 ml) erfolgte mit einer Flußrate von 0,5 ml/min. Eluiert wurden die Proteine mittels eines Stufengradienten (0 min: 100% Lysispuffer, 20 min: 4% Elutionspuffer, 20 min: 20% Elutionspuffer, 30 min: 100% Elutionspuffer) bei einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min.

Lysispuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH8,0
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
5 % Glycerin (v/v)
1 Tablette Proteaseinhibitor „Complete EDTA free“ (Firma: Roche) pro 50ml Lysispuffer

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
5 % Glycerin (v/v)

2.5.4 Messung der α -Tocopherol-Biosynthese

In Anlehnung an den radioaktiven Bioassay für Paprika (2.4.2) wurde ein nicht radioaktiver Testansatz entwickelt.

Der Testansatz (500 μ l) war wie folgt zusammengesetzt:

Tricin-NaOH (pH 8,5)	50 mM
S-Adenosyl-L-Methionin	25 μ M [Sigma; Chloridsalz]
γ -Tocopherol	50 μ M [Sigma]

Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von 1-5 μ g γ -TMT. Nach der Inkubation der Probe für 2,5 Stunden bei 25°C im Dunkeln wurde die Reaktion durch die Zugabe von 750 μ l Chloroform/Methanol (1:2 v/v) gestoppt. Anschließend wurde mit 750 μ l 0,9 %iger NaCl-Lösung ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde verworfen, die organische Phase abgedampft und die Rückstände in 1 ml Methanol aufgenommen.

Die Detektion erfolgte nach der HPLC-Trennung (Waters 2690 Separations Module; Auswertesoftware: Millennium³²) über die Fluoreszenz (Detektor: Jasco FP-9205). Die Anregung erfolgte bei 295 nm und die Emission bei 332 nm. Für die Trennung wurde eine Pronto-sil 200-3-C30-Säule (Bischoff Chromatography; NC (230 x 4,6 mm, 3,0 μ m)) verwendet. Eluiert wurde isokratisch mit 100% Methanol und einem Fluß von 1 ml/min.

2.6 Elektrophorese

2.6.1 SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970).

2.6.1.1 Aufarbeitung der Proben

Die Proben wurden in Probenpuffer bei Raumtemperatur solubilisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 95°C wurde die Probe 5 Minuten zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu sedimentieren.

Probenpuffer:

Na ₂ CO ₃	56 mM
DTT	56 mM
EDTA	2 mM
SDS	2 % (v/v)
Saccharose	12 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

2.6.1.2 Zusammensetzung der Gele und Elektrophoresebedingungen

Es wurden Minigele mit einer Acrylamidkonzentration von 12,5 % (w/v) im Trenngel verwendet. Die Geldicke betrug 0,75 bzw. 1 mm (Gele für die Sequenzierung). Die Sammelgele hatten eine Länge von 0,5 – 1 cm und die Länge der Trenngele lag bei ca. 6 cm. Als Elektrophoresesystem wurde das BioRad-System (BioRad Mini-Protean II Cell) verwendet.

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Sammelgel:

Tris/HCl (pH 6,8)	0,13 M
SDS	0,1 % (w/v)
Acrylamid	4,6 %
N,N-Methylenbisacrylamid	0,12 %
APS	0,06 % (w/v)
TEMED	0,1 %

Trenngel:

Tris/HCl (pH 8,8)	0,38 M
SDS	0,1 % (w/v)
Acrylamid	12,5 %
N,N-Methylenbisacrylamid	0,33 %
APS	0,05 % (w/v)
TEMED	0,05 %

Zusammensetzung der Stammlösungen:

Tris/HCl (pH 6,8)	0,5 M
Tris/HCl (pH 8,8)	1,5 M
Rotiphorese Gel 30 – Gebrauchsfertige Acrylamidstammlösung (Acrylamid Stock)	30 %ige Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1, gasstabilisiert
SDS	10 % (w/v)
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v)
N,N,N',N' - Tetramethyldiamin (TEMED)	

Elektrophoresepuffer:

Tris/HCl (pH 8,3)	50 mM
Glycin	380 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Für zwei Gele wurde folgende Menge der Stammlösungen eingesetzt:

Sammelgel	ml	Trenngel	ml
Tris/HCl (pH 6,8)	2,5	Tris/HCl (pH 8,8)	2,5
Acrylamid Stock	1,3	Acrylamid Stock	4,0
Wasser	6,1	Wasser	3,35
SDS	0,1	SDS	0,1
TEMED	0,01	TEMED	0,005
APS	0,05	APS	0,05
Total	10	Total	10

Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke (25 mA/Gel), bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront nach ca. 1 Stunde das Gelende erreichte.

Für die Gele, die anschließend für die Sequenzierung eingesetzt wurden, betrug die aufgetragene Proteinmenge pro Bahn 20 – 40 µg. Die Gele für die Coomassie – Färbung wurden mit 15 µg und solche für die Silberfärbung mit 0,5 – 3 µg beladen. Das Auftragevolumen betrug 10 – 20 µl.

Zur Identifizierung des Molekulargewichts der aufgetragenen Proteine wurden folgende Proteinmarker eingesetzt:

LMW ELECTROPHORESIS CALIBRATION KIT von Amersham Pharmacia Biotech:

Phosphorylase b	94 kDa
Rinderserumalbumin (BSA)	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Sojabohnen- Trypsin Inhibitor	20,1 kDa
α-Lactalbumin	14,4 kDa

2.6.1.3 Färbung der Gele

2.6.1.3.1 Silberfärbung

(Jungblut & Seifert 1990)

Die Silberfärbung weist gegenüber der Coomassie Brilliant Blue – Färbung eine bis zu hundertfach gesteigerte Empfindlichkeit auf. Die Empfindlichkeit beträgt 5 – 30 ng / 0,5 cm Bande.

Die Silberfärbung wurde wie folgt durchgeführt:

Arbeitsschritt	Lösungen	Dauer
Fixierung	50 % Methanol 10 % Essigsäure	30 min - über Nacht
Vorbehandlung	30 % Ethanol 0,5 M Natrium-Acetat 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd 0,2 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	2 Stunden
Waschen	H ₂ O bidest	3 x 20 min
Färben	0,1 % (w/v) Silbernitrat 0,01 (v/v) Formaldehyd	30 min
Waschen	H ₂ O bidest	20 sec
Entwickeln	2,5 % (w/v) Na ₂ CO ₃ 0,01 % Formaldehyd pH 10,9	max. 25 min bei Raumtemperatur
Abstoppen	50 mM EDTA	
Aufbewahrung	H ₂ O bidest.	

2.6.1.3.2 Coomassie – Färbung

Bei der Coomassie – Färbung wurden die Proben durch Inkubation für 30 Minuten in einer Färbelösung fixiert und angefärbt und anschließend in der Entfärbelösung gewaschen (2 - 3 mal) bis der Gelhintergrund nahezu farblos war.

Die Zusammensetzung der Lösung:

Färbelösung:

Coomassie Blue (Serva Blau R)	1,25 g
Methanol	227 ml
Essigsäure	46 ml
dest. Wasser	ad. 500 ml

Entfärber:

Methanol	40 %
Essigsäure	10 %
dest. Wasser	50 %

2.7 Proteinanalyse durch „Western Blotting“

Um eine Sequenzanalyse der gereinigten Proteine mittels Edman-Abbau durchzuführen, wurde die Proteinfraction des letzten Reinigungsschrittes gelelektrophoretisch getrennt und auf PVDF-Membran übertragen. Die mit Amidoschwarz gefärbten Proteinbanden wurden aus der getrockneten Membran ausgeschnitten und der Sequenzanalyse unterworfen.

Für die immunologische Untersuchung der Expression der γ -Tocopherolmethyltransferase in *E. coli* wurde die Markierung des Enzyms mittels eines Histidin-tag ausgenutzt. Auch in diesem Fall wurde der Proteinextrakt der *E. coli*-Zellen gelelektrophoretisch getrennt und auf PVDF-Membran übertragen. Als Markerproteinmix wurde der „6 x His Protein Ladder“ von Qiagen benutzt. Die Proteinbanden wurden auf der Membran mittels Ponceaurot gefärbt. Das gesuchte Protein wurde durch Antikörperbindung und Lumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.7.1 Blotting

Nach dem Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese durch den elektrophoretischen Transfer vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran immobilisiert. In dieser Arbeit wurde die Methode des „Semidry-Blotting“ zwischen zwei Graphitplatten unter Verwendung eines diskontinuierlichen Verfahrens genutzt:

Anodenlösung I	0,3 M Tris-Base 20 % (v/v) Methanol
Anodenlösung II	25 mM Tris-Base 20 % Methanol
Kathodenlösung	40 mM 6-Aminohexansäure 0,01 % SDS (g/v) 20 % Methanol

Die Gele wurden ca. 5 min in Anodenlösung II äquilibriert. Die PVDF-Membran (Millipore Immobilon P; 7 x 9 cm) wurde 1-3 s mit Methanol angefeuchtet, dann für 1-2 Minuten in Wasser und anschließend kurz in Anodenlösung I getaucht. Der Aufbau der Blotting-Apparatur erfolgte wie in Abbildung 2-1 beschrieben.

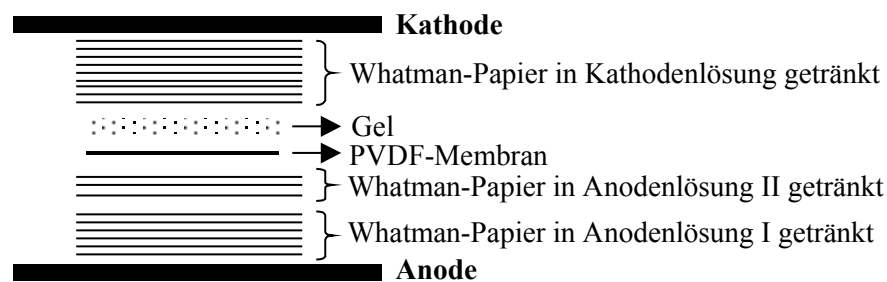


Abbildung 2-1: Aufbau der Blotting-Apparatur

Der Transfer erfolgte für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit konstantem Strom ($0,8 \text{ mA/cm}^2$).

2.7.2 Amidoschwarz-Färbung

Die Proteinbanden auf der PVDF-Membran wurden in einer Lösung bestehend aus 0,1 % (w/v) Amidoschwarz, 5 % (v/v) Methanol und 7 % Essigsäure für ca. 1 Minute angefärbt. Der Filterhintergrund wurde anschließend mit 50 % (v/v) Methanol entfärbt. Nach dem Waschen des Filters in Wasser wurde dieser zwischen Whatman-Papier getrocknet.

2.7.3 Ponceaurot-Färbung

Der Blot wurde 1-2 min bei Raumtemperatur in Ponceaurot (2 % in 3 %iger Trichloressigsäure) inkubiert und die überschüssige Farbe danach mit Wasser entfernt.

Bei der Färbung handelt es sich um eine Methode, die reversibel ist und sich mit einer anschließenden Immunfärbung verträgt. Die Trichloressigsäure in der Färbelösung fixiert gleichzeitig die Proteine auf dem Blot.

2.7.4 Immunfärbung

Die immobilisierte Membran wurde über Nacht bei 4°C mit einer Lösung aus 0,5 % I-Block und 0,1 % Tween 20 behandelt. Anschließend wurde die Membran auf eine Folie gelegt, mit 1 ml Antikörper 1 in I-Block-Waschpuffer beträufelt und eine zweite Folie blasenfrei darübergelegt. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Membran zweimal 10 Minuten in TBST-Puffer und einmal 10 Minuten in I-Block-Waschpuffer mit 1 % Tween gewaschen. Danach folgte nach dem gleichen Prinzip eine 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Antikörper 2, worauf die Membran zweimal 5 Minuten mit TBST, einmal 10 Minuten mit I-Block-Waschpuffer mit 0,15 % Tween und zweimal 5 Minuten mit DEA-Puffer gewaschen wurde. Das Sichtbarmachen der Proteine erfolgte durch analoge Inkubation der Membran (5 min bei Raumtemperatur) mit 2,5 µl/ml CDP-Star-Reagens (TROPIX) und 100 µl/ml Sapphire blue (TROPIX) in DEA-Puffer (pH 10). Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt, für 15 bis 30 Minuten in einer Autoradiographie-Kassette auf einem Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak) exponiert und nachfolgend entwickelt (Entwickler und Fixierer, Kodak).

	Verdünnung	Puffer
1. Antikörper		
Tetra Anti-His (Qiagen)	1 : 1000	I-Block-Waschpuffer + 1 % Tween
2. Antikörper		
Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Rat Anti-Mouse IgG (H+L) (Dianova)	1 : 5000	I-Block-Waschpuffer + 0,15 % Tween

Tabelle 2-3: Verwendete Antikörper

10 x TBST	100 mM Tris-HCl pH 8 1,5 M NaCl 0,5 % Tween 20 1:10 verdünnt einsetzen
I-Block-Waschpuffer	0,2 % I-Block (TROPIX)
0,15 % bzw. 1 % Tween	0,15 % bzw. 1 % Tween 20 in PBS
10 x PBS	77,33 mM Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O 22,66 mM NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O 1,5 M NaCl pH 7,3 – 7,4 nach 1:10 Verdünnung einstellen
DEA-Puffer	0,1 M Diethanolamin 1 mM MgCl ₂ pH 10

Tabelle 2-4: Verwendete Puffersysteme für die Immunfärbung

2.8 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue G – 250“ oder „Serva Blau G“ an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Der Vorteil gegenüber anderen Proteinmeßverfahren besteht in der schnellen Ausbildung des Farbkomplexes, die nach 2 Minuten beendet ist.

Das Reagens wurde wie folgt hergestellt:

Serva Blau G	70 mg
96 % Ethanol	50 ml
dest. Wasser	600 ml
86 % Phosphorsäure	100 ml

Die Lösungen wurden gemischt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt und filtriert. Das Farbreagens ist lichtempfindlich und ist deshalb lichtgeschützt aufzubewahren.

Daneben wurde auch die entsprechende Farbreagenslösung der Firma Bio-Rad (Protein Assay; Farbstoff – Konzentrat; Cat. 500 – 0006) verwendet. Dieses Produkt wurde aus-

schließlich bei der Verwendung von Mikrotiterplatten in der Verdünnung von 1:5 im Test eingesetzt.

50 µl einer Probe (Proteingehalt zwischen 5 bis 10 µg) wurden mit 1 ml Farbreagens versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Blindwert wurden 50 µl Pufferlösung verwendet. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm (Uvikon 930) bestimmt. Bei der Verwendung von Mikrotiterplatten wurden 2 µl Probe und 200 µl Farbreagens verwendet.

Die Eichreihe wurde mit BSA im Bereich von 0 bis 20 µg erstellt.

2.9 Proteinfällung durch Chloroform – Methanol

(Wessel und Flügge, 1984)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine denaturierende Fällung. Verglichen mit anderen Methoden (z.B. Aceton- oder TCA-Fällung) bietet die mit Chloroform – Methanol eine nahezu vollständige Fällung der Proteine auch aus stark verdünnten Lösungen (bis zu 2 µg/ml). Außerdem hat diese Methode noch den Vorteil, daß die Proben gleichzeitig von Detergenzien und Salzen befreit werden, welche bei der SDS – PAGE stören.

100 µl Proteinlösung wurden mit 400 µl Methanol versetzt und durchmischt. Anschließend wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt und die Lösung wiederum kurz geschüttelt. Bei hohem Gehalt an Lipiden oder Detergens wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt. Nach der Zugabe von 300 µl Wasser und guter Durchmischung wurde die Probe 5 Minuten auf Eis inkubiert und danach 2 Minuten bei 9000 x g zentrifugiert, bis sich eine deutliche Phasentrennung zwischen Chloroform und wässriger Oberphase ausgebildet hatte. Die denaturierten Proteine befanden sich in der Interphase.

Die Oberphase wurde ohne Zerstörung der Interphase abgehoben. Zum verbleibenden Rest wurde 300 µl Methanol gegeben, die Mischung geschüttelt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und das Protein durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 9000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Protein bei Raumtemperatur oder 37°C getrocknet.

Bei der Verwendung für die SDS – PAGE oder bei der denaturierenden Gelfiltration wurden die Proteinsedimente direkt in den entsprechenden Probenpuffern resuspendiert.

2.10 Darstellung der Vorstufen der α - Tocopherolbiosynthese

Die Vorstufen wurden nach der Methode von Soll 1985 dargestellt. Sie wurden als Standard für die Dünnschichtchromatographie und als Substrate der Tocopherolbiosynthesemessungen verwendet.

2.10.1 Darstellung von 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon

[2,5-Cyclohexadien-1,4-dion-2-methyl-5-(3,7,11,15)-tetramethyl-2-hexadecenyl]

Zu einer Mischung aus 1,1 mmol 2-Methylhydrochinon (Fa. Schuchardt), 200 mg Al_2O_3 und 1,1 mmol Isophytol wurde tropfenweise BF_3 (0,3 ml BF_3 in 1ml frisch dest. Tetrahydrofuran) hinzugegeben. Die Mischung wurde anschließend 35 Stunden unter Argon gerührt. Das restliche BF_3 wurde dann in Eis hydrolysiert. Die prenylierten Hydrochinone wurden mit Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter Argon entfernt und das Hydrochinon mit 400 mg Ag_2O in Diethylether oxidiert. Das Chinon ist stabiler als das Hydrochinon.

Die synthetisierten Verbindungen wurden mittels Flashchromatographie gereinigt und die Reinheit über Dünnschichtchromatographie kontrolliert.

2.10.2 Darstellung von 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-hydrochinon

[2,5-Cyclohexadien-1,4-dion-2,3-dimethyl-5-(3,7,11,15)-tetramethyl-2-hexadecenyl]

Die Synthese von 2,3-Dimethylhydrochinon wurde analog zu 2.10.1 durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente lediglich 2,3-Dimethylhydrochinon.

2.10.3 NMR Untersuchung

Die Identität der synthetisierten Verbindungen wurde durch NMR-Analyse überprüft. Die NMR-Spektroskopie wurde bei 300 MHz in CDCl_3 durchgeführt.

Als interner Standard für ^1H -NMR-Spektren wurden Tetramethylsilan (0,00 ppm) bzw. Chloroform (7,26 ppm) im jeweiligen Lösungsmittel verwendet. Die chemischen Verschie-

bungen wurden in ppm, die Kopplungskonstante in Hertz angegeben. Die $^1\text{H-NMR}$ -Integrale stimmten mit den getroffenen Zuordnungen überein.

2.11 Statistische Auswertung der durchgeführten Experimente

Die in dieser Arbeit angegebenen Ergebnisse geben einen typischen Verlauf aller durchgeführten Experimente oder aber zusammengefaßte Ergebnisse wieder. Im letzten Fall wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung (SD) als mittlerer Fehler der Einzelmessungen angegeben.

$$\text{Mittelwert} = \frac{\sum \text{Einzelmessungen}}{\text{Anzahl der Einzelmessungen}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Die Anzahl der durchgeführten Experimente (n) betrug mindestens drei, wenn dies nicht anders im Text angegeben ist.

Die K_m - und v_{\max} -Werte der Enzymreaktionen sowie der Inhibitor-Experimente wurden nach den Methoden von Lineweaver-Burk und Hanes graphisch ausgewertet. Für die K_m -Werte wurde zusätzlich noch die Methode nach Eadie-Hofstee verwendet. Diese Verfahren setzen die Meßwerte in einen linearen Zusammenhang. Dabei handelt es sich um Sonderfälle eines linearen Zusammenhanges mit der folgenden Formel: $y = A + Bx$. Infolge der Meßfehler stimmt der y -Wert im Allgemeinen nicht mit dem wahren Meßwert y überein. Aus diesem Grund ist es wichtig, Ausgleichsrechnungen zur Bestimmung der Fehler von A und B durchzuführen.

Der Fehler von B wird auch Standardfehler von y genannt und wurde wie folgt bestimmt:

$$\bar{s}_B = s_y \sqrt{\frac{1}{n(\bar{x}^2 - \bar{x}^2)}}$$

Der Fehler von A wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\bar{s}_A = s_y \sqrt{\frac{\overline{x^2}}{n(\overline{x^2} - \bar{x}^2)}}$$

Aus dem Fehler von B läßt sich der Fehler von K_m und aus dem Fehler von A der von v_{\max} berechnen. Die errechneten Fehler für K_m und v_{\max} in der vorliegenden Arbeit waren nicht größer als 10 %.

Zusätzlich wurden noch Standardfehler und Korrelationskoeffizient bestimmt. Der Standardfehler der geschätzten y-Werte für alle x- Werte der Regression ist ein Maß dafür, wie groß der Fehler bei der Prognose des zu einem x-Wert gehörenden y-Wertes ist. Der Wert des Standardfehlers war $< 0,008$.

Der Korrelationskoeffizient mißt den Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen. Die Korrelation der Grundgesamtheit ergibt sich aus der Kovarianz zweier Datensätze, dividiert durch das Produkt aus deren Standardabweichung. Die Korrelationskoeffizienten der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Beziehungen waren größer oder gleich 0,9.

Das Verhältnis v_{\max}/K_m wurde für die Substrate jeder einzelnen Präparation berechnet und verglichen. Anschließend wurde für die Darstellung der Mittelwert über alle Präparationen gebildet. Die Standardabweichung betrug nicht mehr als 10 %.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Tocopherolgehalte bei Höheren Pflanzen und Grünalgen

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben der Tocopherolgehalte verschiedener Organismen aus dem Reich der Höheren Pflanzen und der Grünalgen. Dieser Umstand ist in erster Linie auf die unterschiedlichen Meßmethoden zurückzuführen, welche zur Erzeugung der Daten verwendet wurden. Somit war ein direkter Vergleich der Tocopherolgehalte anhand der Literatur nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Organismen aus dem Reich der Höheren Pflanzen und Grünalgen, welche für fortführende Arbeiten von Interesse sein könnten, auf ihren Tocopherolgehalt hin untersucht (Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2). Wie aus den Tabellen zu entnehmen ist, wird in den untersuchten Samen vorwiegend γ -Tocopherol gespeichert. Früchte mit hohen Carotinoidgehalten scheinen auch relativ große Mengen an α -Tocopherol zu akkumulieren. Die Tocopherolzusammensetzung in Grünalgen ist im Allgemeinen mit der in grünen Pflanzen und Früchten zu vergleichen.

	α -Tocopherol	β -Tocopherol	γ -Tocopherol
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
Sproß	0,78 ng/g FG	n. d.	0,3 ng/g FG
Samen	n. d.	n. d.	463 μ g/g TG
<i>Pisum sativum</i>			
Greenfast – Samen	n. d.	n. d.	91 μ g/g TG
<i>Tagetes patulus</i>			
Blütenblätter	571 μ g/g TG	47 μ g/g TG	648 μ g/g TG
<i>Capsicum annuum</i>			
Topboy (GWH)	109 μ g/g TG	4 μ g/g TG	n. d.
Pustagold (GWH)	13 μ g/g TG	n. d.	n. d.
Topgirl (GWH)	146 μ g/g TG	n. d.	n. d.
Szergedine (GWH)	190 μ g/g TG	7 μ g/g TG	n. d.
Grüne Frucht (Markt)	61 μ g/g TG	5 μ g/g TG	n. d.
Gelbe Frucht (Markt)	75 μ g/g TG	18 μ g/g TG	2 μ g/g TG
Rote Frucht (Markt)	171 μ g/g TG	28 μ g/g TG	7 μ g/g TG
<i>Lycopersicum esculentum</i>			
Sink Blatt	85 μ g/g TG	n. d.	n. d.
Source Blatt	376 μ g/g TG	n. d.	n. d.
Senescentes Blatt	130 μ g/g TG	n. d.	n. d.
Frucht	150 μ g/g TG	4 μ g/g TG	20 μ g/g TG

Tabelle 3-1: Tocopherolgehalte bei Vertretern Höherer Pflanzen (δ -Tocopherol n.d.)

	α -Tocopherol
<i>Dunaliella bioculata</i>	
(1 M NaCl)	84 $\mu\text{g/g}$ TG
(0,1 M NaCl)	52 $\mu\text{g/g}$ TG
<i>Chlorella sorottiana</i>	64 $\mu\text{g/g}$ TG
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	≈ 150 $\mu\text{g/g}$ TG

Tabelle 3-2: Tocopherolgehalte bei Vertretern von Grünalgen (β -, γ - und δ -Tocopherol wurde nicht detektiert)

3.2 Untersuchung verschiedener Varietäten von *Capsicum annuum*

Da angenommen wird, daß die Tocopherole als Antioxidantien der Lipidoxidation entgegenwirken (Fryer 1992), wurde in dieser Arbeit versucht, einen Zusammenhang zwischen Tocopherolsynthese und Lipidgehalt nachzuweisen.

Tabelle 3-3 zeigt im Perikarp von Paprikafrüchten (vom lokalen Markt) einen Zusammenhang zwischen der Carotinoid-Akkumulation und Tocopherolspiegeln einerseits und Triacylglyceringehalten mit relativ hohen Anteilen an Linol- (20–50%) und Linolensäure (15–25%) andererseits. Die Tocopherolzusammensetzung ist durch hohe Konzentrationen an α -Tocopherol (80–90%) und niedrige Gehalte an β - (< 20%) und γ -Tocopherol (< 3%) gekennzeichnet (Tabelle 3-1).

Fruchtfarbe	[$\mu\text{mol} / \text{g}$ Trockengewicht]		
	α -Tocopherol	Triacylglycerin	$\text{C}_{18:2} + \text{C}_{18:3}$ in Triacylglycerin
Grün	$0,142 \pm 0,03$	$1,61 \pm 0,43$	$2,41 \pm 0,37$
Gelb	$0,177 \pm 0,04$	$3,88 \pm 0,50$	$3,48 \pm 0,45$
Rot	$0,397 \pm 0,09$	$7,59 \pm 0,52$	$14,39 \pm 2,88$

Tabelle 3-3: Anstieg der α -Tocopherol- und Triacylglycerinkonzentrationen sowie der in Triacylglycerin gebundenen höher ungesättigten Fettsäuren [$\text{C}_{18:2} + \text{C}_{18:3}$] im Perikarp von Paprikafrüchten vom Markt mit zunehmendem Carotinoidgehalt.

Im Weiteren sollte untersucht werden, welche Fruchtsorte von Paprika sich besonders für die Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase, einem Enzym aus der Tocopherolbio-

synthese, eignet. Bei der Paprika handelt es sich um eine Frucht, die größere Mengen α -Tocopherol bildet und somit auch das Enzym anreichern sollte.

Um den Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Gehalt zu untersuchen, wurden Paprikafrüchte verschiedener Varietäten vom Markt auf ihren Gehalt an α -Tocopherol untersucht. Von den Varietäten mit höherem α -Tocopherol-Gehalt wurden die γ -Tocopherolmethyltransferase-Aktivitäten näher untersucht.

	Grüne Frucht	Gelbe Frucht	Rote Frucht
α -Tocopherol – Gehalt in [μ g g Trockenmasse]	61	75	171
spezifische Aktivität in [fkat/mg Protein]	nicht gemessen	4,8	7,5
Acetonpulver-Ausbeute in [g]	nicht gemessen	ca. 0,5	ca. 1

Tabelle 3-4: Zunahme der α -Tocopherolkonzentration und der γ -Tocopherolmethyltransferase-Aktivitäten in Paprikafrüchten mit steigendem Carotinoid-Gehalt.

Rote Früchte weisen die höchste γ -Tocopherolmethyltransferase- Aktivität mit 7,5 fkat/mg Protein auf und wurden deshalb als Ausgangsmaterial für die Enzymreinigung verwendet.

3.3 Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase aus Fruchtschalen von *Capsicum annum* der roten Varietät

Da die Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase anhand des publizierten Protokolls von Camara et al. (1985) bis zur vollständigen Homogenität nicht nachvollzogen werden konnte, wurde Schritt für Schritt ein neues Reinigungsprotokoll erstellt. Die Reinigungssequenz von Camara et al. umfaßte folgende Schritte: Isolierung intakter Chromoplasten, Anreicherung der Plastidenhüllmembran, Acetonfällung, Ammoniumsulfatfällung 20%-40%, Affinitäts-Chromatographie und –Rechromatographie an Blue Sepharose unter Verwendung ver-

schiedener Puffersysteme und einer Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sepharose.

Im Vergleich zu Camara et al. (1985), die von 4 kg Frischgewicht ausgegangen sind, wurde hier die dreifache Menge an Paprikaperikarp eingesetzt. Der Aufschluß des Pflanzenmaterials erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben. Vor der Beladung der ersten Säule erfolgte eine Aceton- und eine fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (2.4.4 - 2.4.5), die die Gesamtproteinmenge deutlich verringerte.

Folgendes Reinigungsschema zeigte bei der Reinigung der γ -TMT die optimale Anreicherung (Abbildung 3-1).

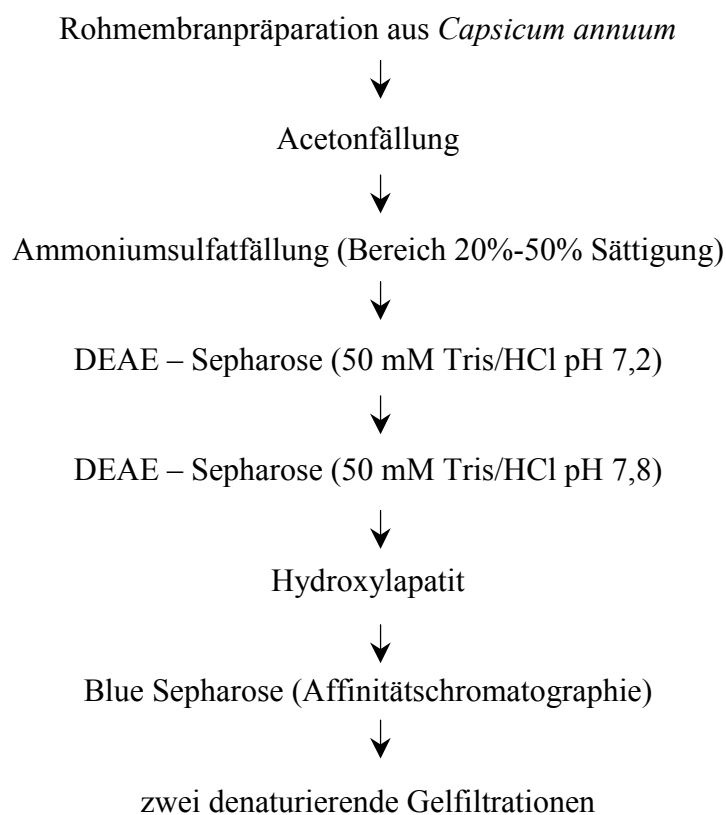


Abbildung 3-1: Flußdiagramm für die Reinigung der γ -TMT aus Paprikaperikarp. Die einzelnen säulenchromatographischen Reinigungsschritte sind unter 2.4.6 näher beschrieben.

Mit dem Anionenaustauscher Ressource Q (Pharmacia Biotech) und dem Affinitätsmaterial Adenosin-Sepharose (Sigma) war kein Reinigungseffekt zu erzielen, da das Enzym während der Chromatographie wesentlich an Aktivität verlor. Beim Test einer RP-Säule (YMC*Gel Butyl C₄: 200 Å, S-5/15 μM) konnte das Enzym nicht mehr von der Säule eluiert werden.

Die Versuche zur Affinitäts-Chromatographie mit SAM als Ligand waren erfolglos. Die Ursache dafür lag offensichtlich in der hohen Instabilität von SAM.

3.3.1 Elutionsprofile

Die Elutionsprofile der für die Reinigung der γ -TMT benutzten Säulen mit der jeweiligen Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), der Volumenaktivität (fkat), der spezifischen Aktivität (fkat/mg Protein) und dem Verlauf der Gradienten (M NaCl) sind in

Abbildung 3-2 bis Abbildung 3-5 dargestellt. Detaillierte Informationen zu den jeweiligen Methoden sind unter 2.4.6 – 2.4.7 beschrieben. Die denaturierende Gelfiltration wurde am Ende zweimal durchgeführt.

3.3.1.1 Konventionelle Reinigung

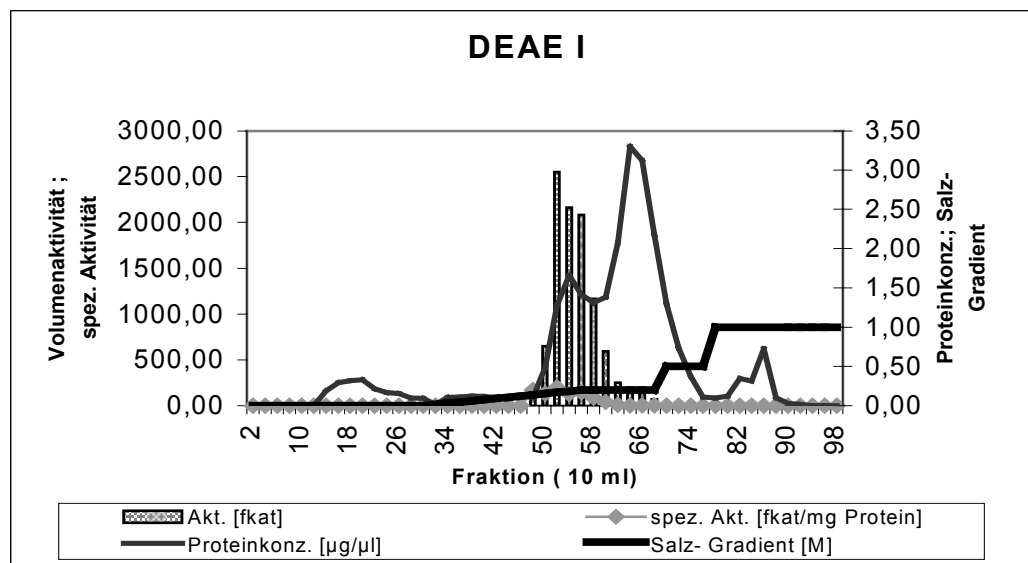


Abbildung 3-2: Elutionsprofil der γ -TMT nach der ersten Anionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Sepharose bei pH 7,2 (Fast Flow). Die Fraktionen 47 bis 59 wurden gepoolt.

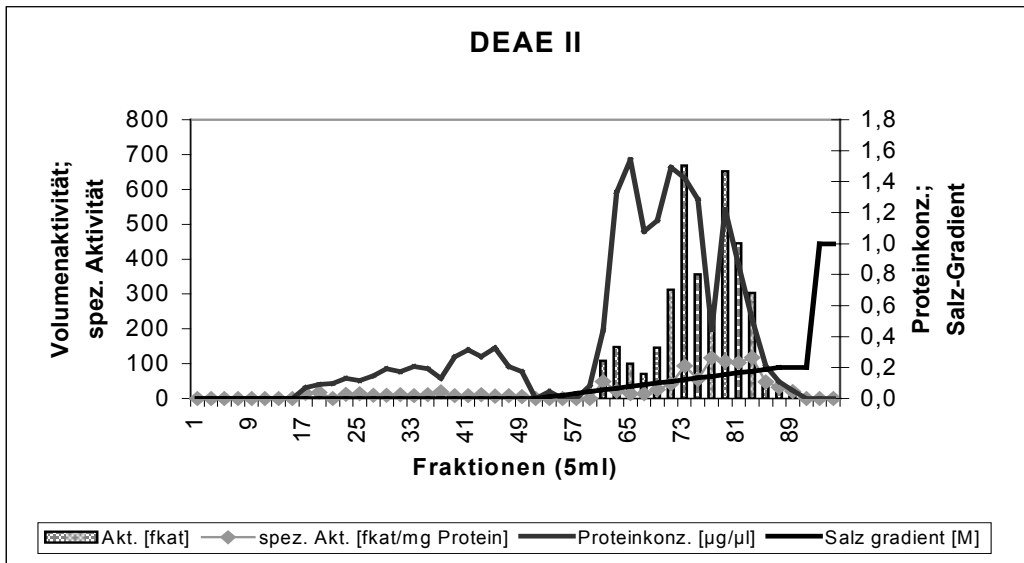


Abbildung 3-3: Elutionsprofil der γ -TMT nach der Anionenaustauscher-Rechromatographie auf DEAE-Sepharose bei pH 7,8 (Fast Flow). Die Fraktionen 71 bis 89 wurden gepoolt.

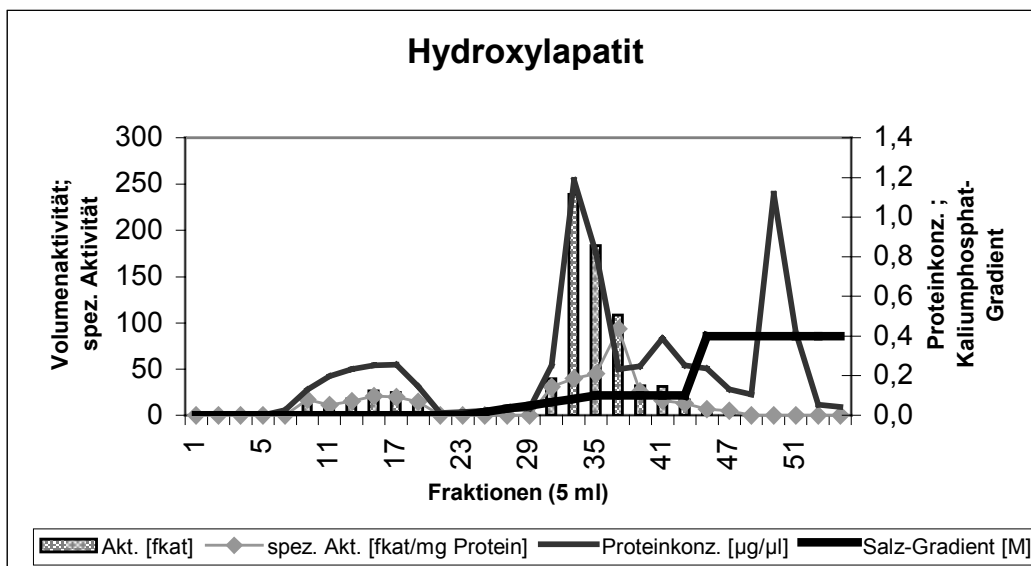


Abbildung 3-4: Elutionsprofil der γ -TMT nach der Hydroxylapatit-Säule. Die Fraktionen 30 bis 39 wurden gepoolt.

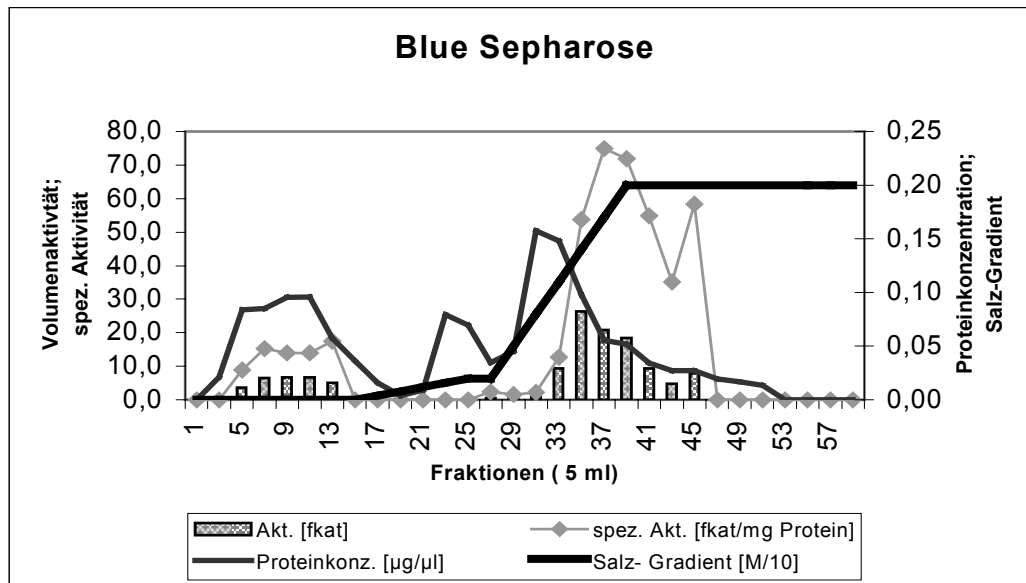


Abbildung 3-5: Elutionsprofil der γ -TMT nach der Blue Sepharose-Säule. Die Fraktionen 34 bis 53 wurden gepoolt und mittels Dialyse (Schlauch-Ausschlußgrenze: 4-6 kDa) gegen 50 % PEG 35000 in 2,5 Tagen bis auf 5 ml eingengt.

Da es während der gesamten Reinigung nicht möglich war, das Enzym auf herkömmliche Art und Weise (Ultrafiltration) zu konzentrieren, mußte das Enzym wie in Abbildung 3-5 und unter 2.4.8 beschrieben mittels PEG konzentriert werden. Konzentrierungsmethoden z.B. mit Ultrafiltrationsmembranen führten zu keinem befriedigenden Ergebnis, weil das Enzym möglicherweise hydrophobe Wechselwirkungen mit Membranen und Gefäßwänden eingeht, von denen es nur unter denaturierenden Bedingungen wieder abgelöst werden kann.

Die Reinigung konnte nur innerhalb von fünf Tagen durchgeführt werden, da das Enzym im verdünnten Zustand sehr instabil war. Versuche, das Enzym mit zweiwertigen Metallionen, Lipiden oder BSA zu stabilisieren, waren erfolglos. Somit war es nicht möglich, das Enzym mit konventionellen Chromatographiemethoden weiter aufzureinigen.

In einer Pufferlösung aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,2), 3mM DTT; 1mM EDTA und 2 % (v/v) Glycerin und bei einer Proteinkonzentration von ca. 15-20 mg/ml betrug die Halbwertszeit des Enzyms 96 h. Hierbei war es unerheblich, ob das Enzym bei 4°C oder bei 25°C gelagert wurde.

3.3.1.2 HPLC-gestützte Reinigung

Da das Enzym während der Aufkonzentrierung erheblich an Aktivität verlor und eine Reinigung auf konventionelle Art und Weise unmöglich war, wurde entschieden, die Reini-

gung mittels denaturierender Gelfiltration fortzusetzen. Hierbei wurde das Enzym gereinigt, indem dreizehnmal 100 µl auf eine zuvor geeichte HPLC-Gelfiltrationssäule injiziert wurden (Abbildung 3-6) und ein Bereich von 30 bis 45 kDa herausgegriffen wurde (Abbildung 3-7, Gelfiltration 1). Die so erhaltenen Fraktionen wurden konzentriert und nochmals in dreimal 100 µl auf die Säule gegeben. Es wurde wieder der Bereich zwischen 30 und 45 kDa fokussiert (Abbildung 3-7, Gelfiltration 2).

Die Kontrolle der Reinigung erfolgte über SDS-PAGE (Abbildung 3-9).

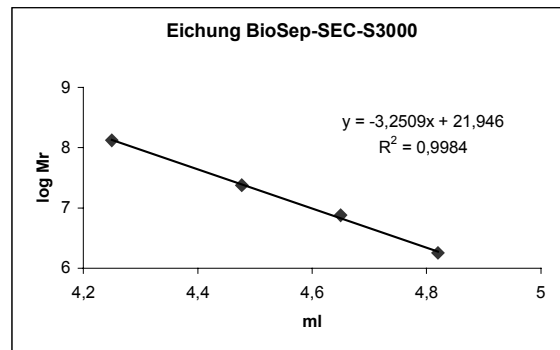


Abbildung 3-6: Eichung der BioSep-SEC-S3000-Säule (BSA 68 kDa, Eialbumin 45 kDa, Carboanhydrase 30 kDa, Myoglobin 17,8 kDa)

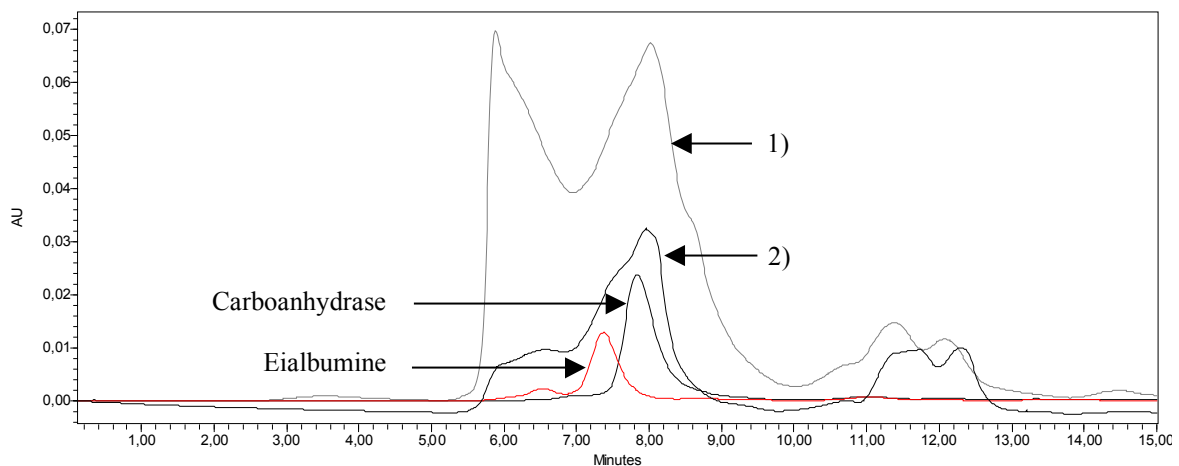


Abbildung 3-7: Elutionsprofil der Enzyme auf der BioSep-SEC-S3000-Säule [1) Gelfiltration 1 und 2) Gelfiltration 2]. Ebenfalls gezeigt werden die Standardenzyme, zwischen denen geschnitten wurde (45 kDa: Eialbumin, 30 kDa: Carboanhydrase).

3.3.2 Reinigungstabelle

In Tabelle 3-5 sind die Ergebnisse der Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase dargestellt. Das Enzym konnte mit einer Ausbeute von 9 % und einem Reinigungsfaktor von 45 partiell gereinigt werden. In den Durchläufen der DEAE II-, Hydroxylapatit- und der Blue Sepharose-Säule befanden sich weniger als 10 % der Gesamtvolumenaktivität.

	Volumen [ml]	Protein [mg]	Aktivität [fkat]	spez. Aktivität [fkat/mg Protein]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Membranpräparation	500	1906	18164,2	9,53	100	1
Rohextraktpräparation	98	1161	20501,1	17,66	113	2
20%-50% (NH ₄) ₂ SO ₄	54	650	24086,0	37,04	133	4
DEAE I	110	187	15481,9	82,80	85	9
DEAE II	54	70	10834,2	154,07	60	16
Hydroxylapatit	48	19	4541,1	235,41	25	25
Blue Sepharose	92	4	1647,6	426,83	9	45

Tabelle 3-5: Reinigungstabelle der γ -Tocopherolmethyltransferase aus der roten Varietät von *Capsicum annuum*

Während der Reinigung wurde ein Nachweis auf Aktivitäten der 2-Methylphytylhydrochinon- und γ -Tocotrienol-Methylierung sowie auf Cyclase-Aktivitäten geführt, um zu untersuchen, ob es sich bei Enzymen der Tocopherolbiosynthese um Einzelenzyme oder um einen Enzymkomplex handelt. 2-Methylphytylhydrochinonmethylierungs- und Cyclase-Aktivitäten konnten nach der ersten Anionenaustauscherchromatographie nicht mehr nachgewiesen werden. Die γ -Tocotrienolmethylierung wies nach der Affinitätschromatographie ähnliche Aktivitäten wie die von γ -Tocopherol auf.

3.3.3 Reinigung anhand der SDS-PAGE

In den nachfolgenden Abbildungen ist die Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase mit der konventionellen Reinigungssequenz und die Reinigung mittels denaturierender Gelfiltration dargestellt. Aus den Abbildungen ist zu erkennen, daß das Enzym nicht bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden konnte. In Abbildung 3-8 ist eine schwache Bande bei 36 kDa zu erkennen. Das Enzym, welches die γ -Tocopherolmethyltransferase-Aktivität aufweist, ist vermutlich 36 kDa groß (siehe Abschnitt 3.4.1)

Wie in Abbildung 3-9 zu sehen ist, konnte mittels der denaturierenden Gelfiltration kein sichtbarer Reinigungseffekt erzielt werden.

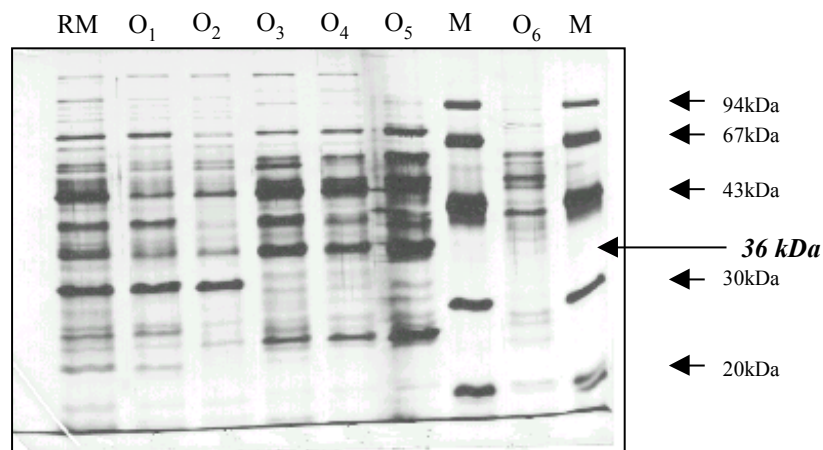


Abbildung 3-8: SDS-PAGE der Reinigungsschritte. Die Proteinextrakte nach den einzelnen Reinigungsstufen wurden in einem 12,5 %igen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Aufgetragen wurde 1 μ g Protein, welches anschließend nach der Silberfärbung von Seifert und Jungblut (1990) angefärbt wurde (RM ... Membran; O₁ ... Extrakt nach Acetonfällung; O₂ ... Extrakt nach (NH₄)₂SO₄-Fällung; O₃ ... Extrakt nach DEAE I; O₄ ... Extrakt nach DEAE II; O₅ ... Extrakt nach Hydroxylapatit; O₆ ... Extrakt nach Blue Sepharose; M ... Proteinmarker).

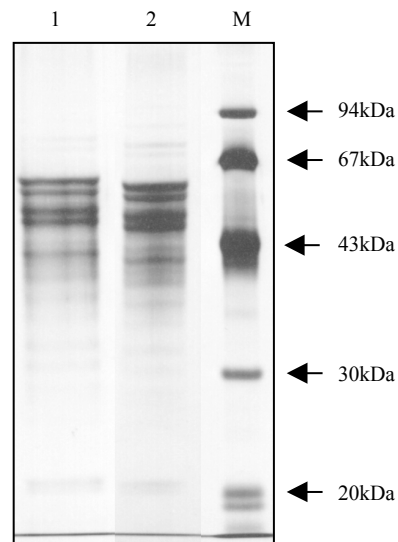


Abbildung 3-9: SDS-PAGE der denaturierenden Gelfiltration. Die Proteinextrakte nach den zwei Gelfiltrationen wurden in einem 12,5 %igen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend nach der Silberfärbung von Seifert und Jungblut (1990) angefärbt (1 ... 1. Gelfiltration; 2 ... 2. Gelfiltration; M ... Proteinmarker).

3.3.4 Proteinsequenzen

Nach verschiedenen Reinigungsschritten mit zum Teil unterschiedlicher Anzahl von Säulen erfolgte am Ende der Reinigungssequenz die Auftrennung der Proteine der gereinigten Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließende Proteinsequenzierung. Dabei konnte wiederholt ein Peptid mit der Molekülmasse von ca. 40 kDa sequenziert werden. Die Sequenzierung erfolgte N-terminal. Bei dem Peptid könnte es sich nach der Teilsequenz um das P-541 Protein aus *Capsicum annuum* handeln, welches von Houlne et al. (1994) beschrieben wurde.

W S F L D L A P T (S) S M E S X

Abbildung 3-10: N-terminale Sequenz des ca. 40 kDa großen Proteins

Weitere Teilsequenzen von Proteinen, welche sich im Bereich von 30 bis 40 kDa auf der SDS-PAGE trennten, konnten mittels der N-terminalen Sequenzierung nicht erhalten werden.

3.4 Charakterisierung der γ -TMT aus Fruchtperikarp von *Capsicum annuum* der roten Varietät

3.4.1 Abschätzung der Molekülmasse

3.4.1.1 Native Gelfiltration an Superdex 200

Die Abschätzung der Molekülmasse der γ -TMT erfolgte am Ende der konventionellen Reinigung an einer geeichten Superdex HR 30/10 Säule. Nach halblogarithmischer Auftragung des Elutionsvolumens gegen die Molekülmasse der Eichproteine konnte eine Molekülmasse von ca. 36 kDa für das native Enzym ermittelt werden (Abbildung 3-11 und Abbildung 3-12). Es gilt zu erwähnen, daß das Enzym nach den ersten Reinigungsstufen eine Molekülmasse von mehr als 600 kDa hatte, d.h. das Enzym lag möglicherweise als Aggregat vor, was eventuell auch erklären könnte, weshalb das Enzym im verdünnten Zustand sehr schnell die Aktivität verlor.

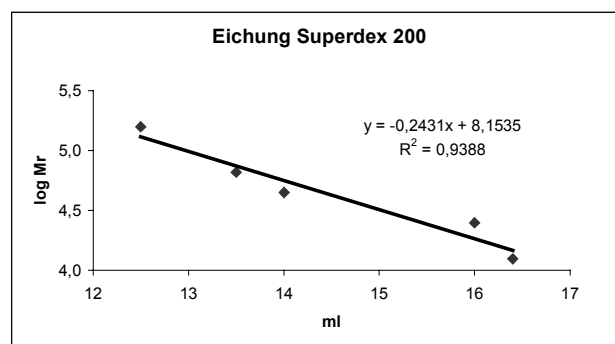


Abbildung 3-11: Eichung der Superdex 200-Säule. (Aldolase 160 kDa, BSA 68 kDa, Eialbumin 45 kDa, Carboanhydrase 30 kDa, Myoglobin 17,8 kDa)

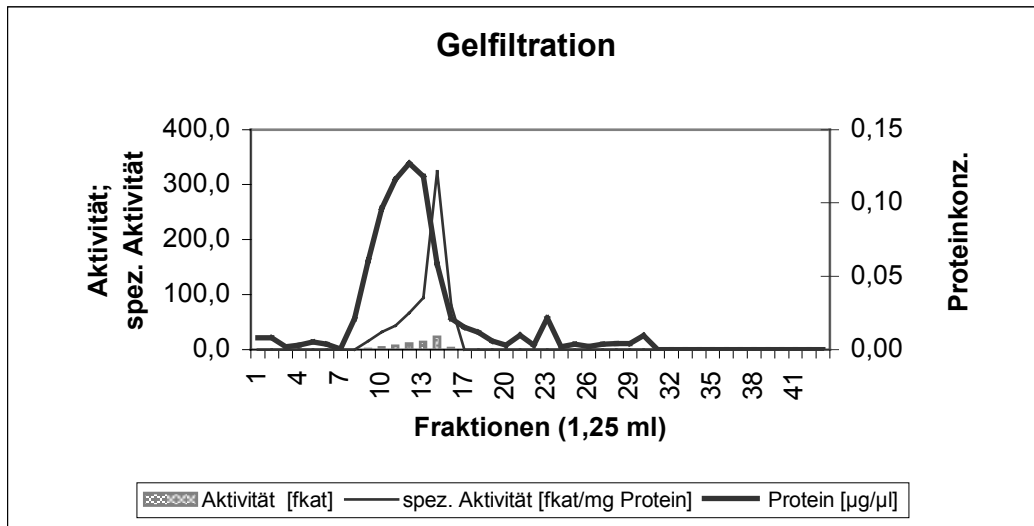


Abbildung 3-12: Elutionsprofil der γ -TMT an der Superdex 200-Säule

3.4.1.2 Photolabelling mit AdoMet

Aus der Literatur ist bekannt, daß die ACC-Synthase (S-Adenosyl-L-methionin-methylthioadenosin-Lyase), ein wichtiges Enzym der Ethylenbiosynthese, während einer irreversiblen Hemmung durch die kovalente Bindung mit ^{14}C -SAM markiert werden kann (Sato et. al 1988, Yip et. al 1990). Subbaramaiah und Simms zeigten 1992, daß sich Methyltransferasen, welche während der Inkubation mit ^{14}C -SAM als Substrat mit einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt wurden, markieren ließen. Da es sich bei der γ -TMT auch um eine Methyltransferase handelt, wurde diese Methode zu ihrer kovalenten Markierung angewendet.

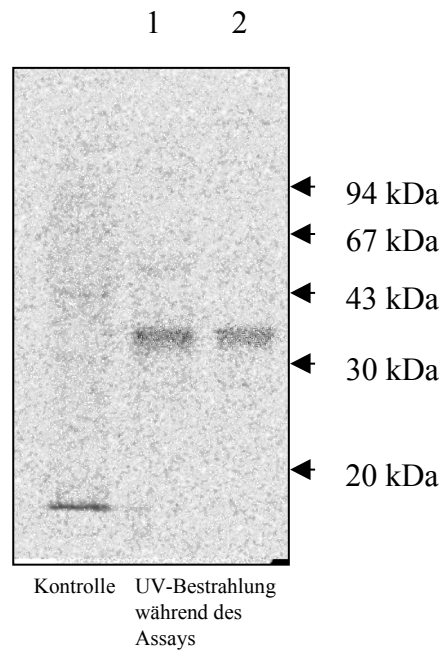


Abbildung 3-13: Radiomarkierung der γ -Tocopherolmethyltransferase nach SDS-PAGE der partiell gereinigten γ -TMT nach dem vorletzten (1) und letzten (2) Säulenreinigungsschritt. Die elektrophoretische Trennung der Proteinextrakte nach der UV-Bestrahlung erfolgte mit einem 12 %igen Trenngel (0,75 mm Dicke). Inkubiert wurden 20 μ g Protein mit 14 μ M [14 C]-SAM für 2 Stunden bei UV-Bestrahlung. Als Kontrolle diente ein Inkubationsansatz ohne UV-Bestrahlung. Es wurde jeweils eine Bande markiert.

Die Inkubation der γ -TMT wurde für unterschiedliche Zeiten durchgeführt, um eine optimale Markierung zu erzielen (30 min, 1 h, 2 h und 5 h). Nach 2 h Inkubation der γ -TMT mit [14 C]-SAM unter UV-Bestrahlung konnte anhand der Markierung im Gel mit Hilfe einer Protein-Eichgerade für γ -Tocopherolmethyltransferase eine Molekülmasse von 36 kDa kalkuliert werden (Abbildung 3-13).

Da nach 30 min und 1 h Inkubation unter UV keine Markierungen sichtbar waren, kann man folgern, daß die Reaktionszeit nicht ausreichend war. Nach 5 h konnte wiederum keine Markierung festgestellt werden. In diesem Fall kam es wahrscheinlich durch die lange UV-Bestrahlung zur Proteinvernetzung, d.h. die Proteine wurden im Gel nicht mehr nach ihren wahren Molekülmassen aufgetrennt (auf dem Gel waren die Proteinbanden verschmiert). Nach 2 h war die Aggregation im Gel in Ansätzen auch schon zu erkennen.

3.4.2 Temperaturmaximum

Die Abhängigkeit der γ -Tocopherolmethyltransferase-Aktivität von der Temperatur wurde nach zwei Stunden Inkubationszeit bei pH 7,5 im Bereich zwischen 20 bis 40°C untersucht. Das Maximum der γ -Tocopherolmethyltransferase-Aktivität lag bei $\approx 35^\circ\text{C}$ (siehe Abbildung 3-14).

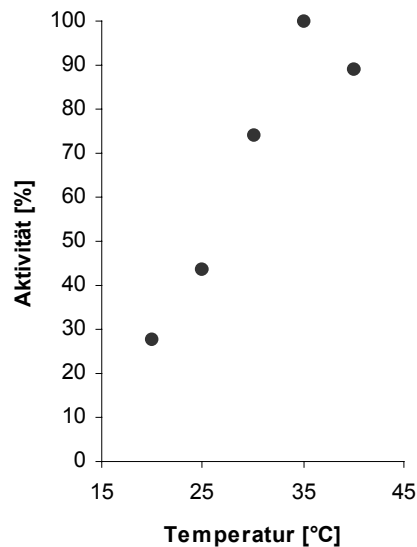


Abbildung 3-14: Temperatur-Maximum unter *in vitro*-Bedingungen im solubilisierten Enzymextrakt nach Acetonfällung

3.4.3 pH-Abhängigkeit

Das pH-Optimum der γ -TMT liegt unter *in vitro*-Bedingungen bei pH 7,5 (Abbildung 3-15). Gemessen wurde bei 25°C mit vier verschiedenen Puffersystemen: pH 5,5-6,5 mit Mes-Puffer, pH 6,5-8,0 mit Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5-9,0 mit Tris/HCl und pH 9,2-10,0 mit Carbonat/Bicarbonat-Puffer.

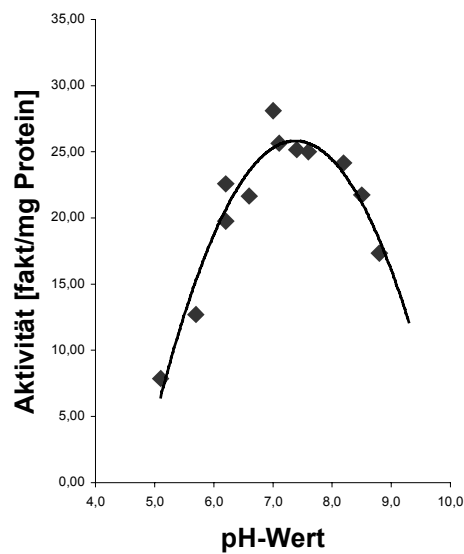


Abbildung 3-15: pH-Optimum der γ -TMT im solubilisierten Enzymextrakt nach Acetonfällung. Das pH-Optimum lag bei pH 7,5.

3.4.4 Abhängigkeit der γ -TMT Aktivität von der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit

In Abbildung 3-16 und Abbildung 3-17 ist die Abhängigkeit der γ -TMT-Aktivität von der Inkubationszeit und der eingesetzten Proteinmenge aufgezeigt. Die Versuche wurden mit dem solubilisierten Enzym nach Acetonfällung durchgeführt.

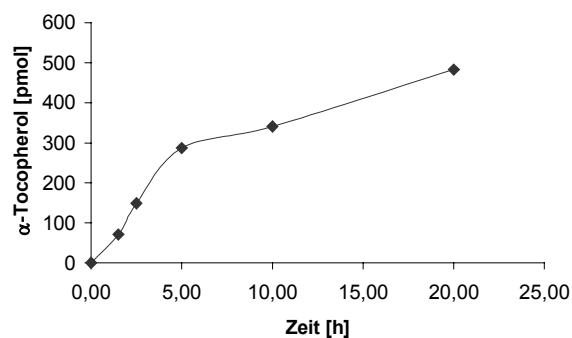


Abbildung 3-16: Zeitabhängige Bildung von α -Tocopherol durch die γ -TMT. Der Assay wurde wie unter 2.5.4 mit dem solubilisierten Enzymextrakt durchgeführt.

Aus Abbildung 3-16 ist zu erkennen, daß der [^{14}C]-SAM Einbau bis zu Inkubationszeiten von ca. 5 Stunden linear verlief. In den nachfolgenden Kinetikstudien wurde die Enzymreaktion über 2 Stunden verfolgt.

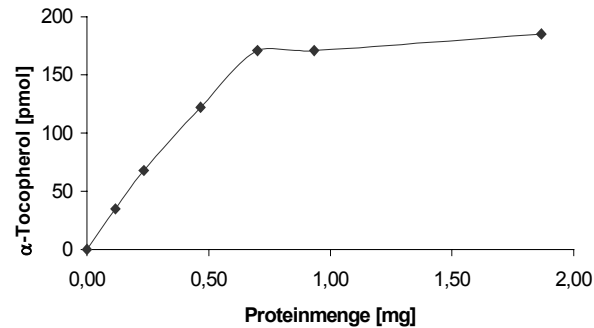


Abbildung 3-17: Abhängigkeit der α -Tocopherol-Bildung von der Proteinmenge. Der Assay wurde wie unter 2.5.4 mit dem solubilisierten Enzymextrakt durchgeführt.

Für die nachfolgenden Kinetikuntersuchungen wurden Proteinmengen zwischen 0,1 und 0,3 mg eingesetzt.

3.4.5 Substratspezifität und kinetische Charakterisierung der γ -TMT

Mit diesen Experimenten sollte untersucht werden, welche Substrate von der γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Capsicum annuum* umgesetzt werden. Getestet wurden γ -Tocopherol, β -Tocopherol und δ -Tocopherol, sowie ihre ungesättigten Formen, die Tocotrienole. SAM diente bei diesen Reaktionen als Methyl donor.

Um zu untersuchen, welche Substrate bevorzugt werden, wurden umfangreiche kinetische Untersuchungen durchgeführt.

3.4.5.1 Substratspezifitäten der γ -Tocopherolmethyltransferase

Wie schon unter 3.3.2 erwähnt, konnte das Enzym nicht bis zur Homogenität gereinigt werden. Da das Enzym sehr instabil war, wurde beschlossen, die Untersuchungen zur Substratspezifität und die kinetische Charakterisierung mit dem relativ stabilen Rohextrakt (solubilisierter Enzymextrakt) durchzuführen. Der Rohextrakt wurde nach der Acetonfällung erhalten (siehe 2.4.4) und enthält keine endogenen Vorstufen der Tocopherolbiosynthese (Daten nicht gezeigt).

Wie in Kapitel 3.4.5.2 gezeigt, akzeptierte die γ -TMT γ - und δ -Tocopherol, sowie die entsprechenden Trienole als Substrate. β -Tocopherol und β -Tocotrienol wurden jedoch nicht von der γ -TMT umgesetzt. Um zu untersuchen, ob es sich bei den Enzymaktivitäten um die Reaktionen eines oder mehrerer Enzyme handelte, wurde das Elutionsprofil unter verschiedenen Trennmethode untersucht.

Die Reinigung wurde wie unter 2.4 bis zur Anionenaustauscher-Chromatographie mittels DEAE-Sepharose (Fast Flow) durchgeführt. Im Anschluß wurde die Chromatofocussing-Technik, wie unter 2.4.10 beschrieben, durchgeführt.

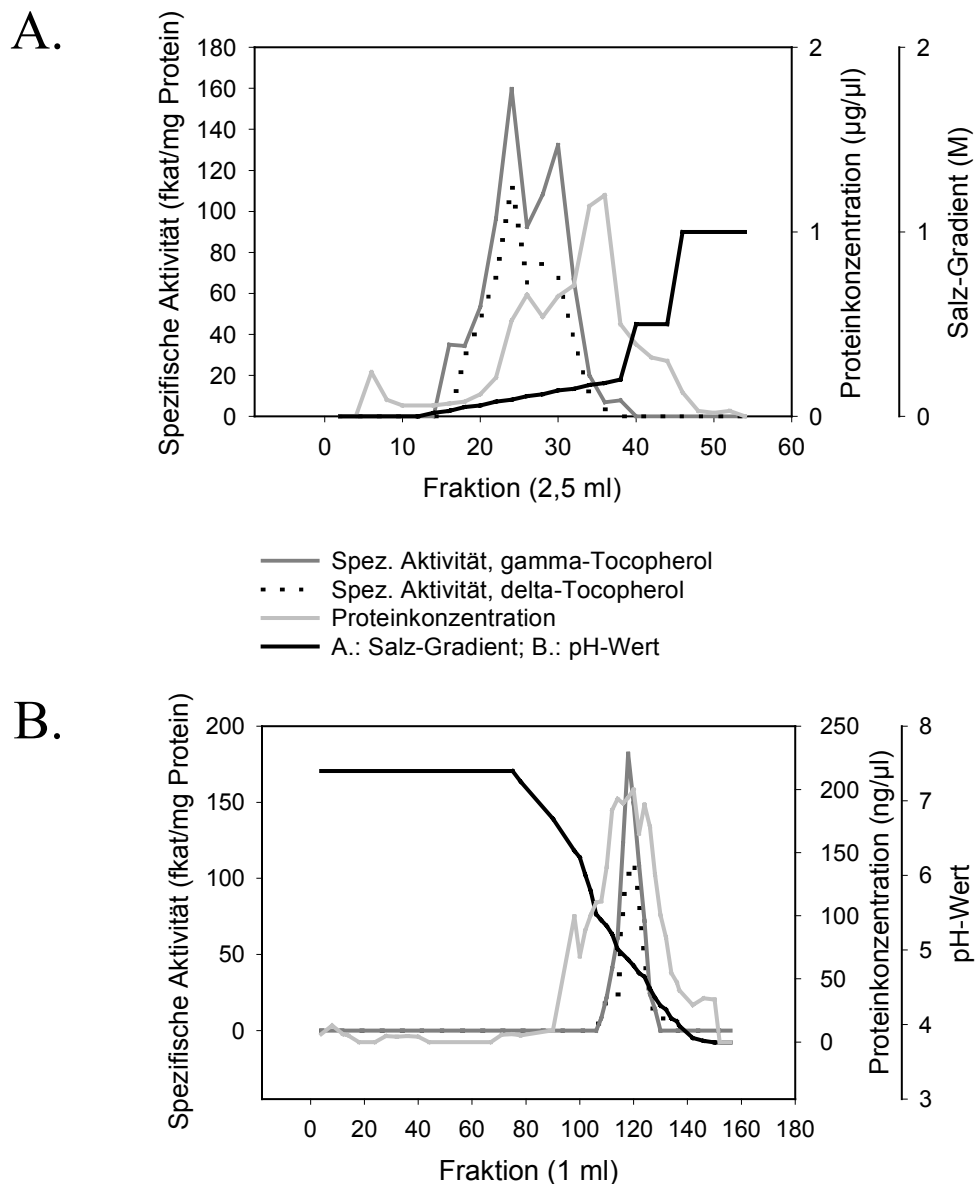


Abbildung 3-18: Elutionsprofil der Methylierungsaktivitäten von γ - und δ -Tocopherol nach DEAE-Sepharose (Fast Flow) (A) und nach Chromatofocussing (B).

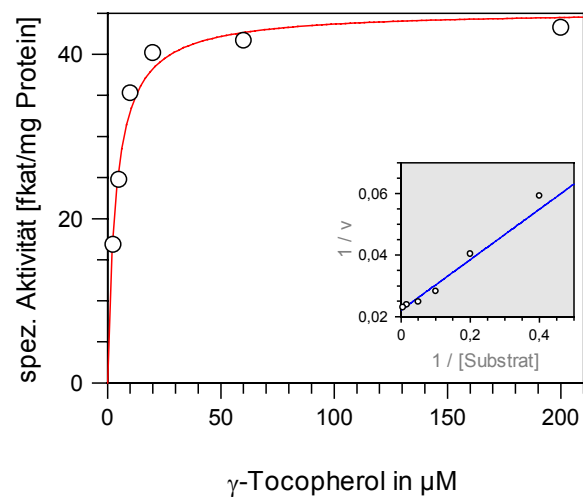
Aus den beiden Diagrammen ist zu entnehmen, daß die Aktivitäten des Methyltransfers auf γ - und δ -Tocopherol gleichzeitig eluierten. Außerdem wies die Methyltransferase nach dem letzten Reinigungsschritt auf Blue Sepharose Methylierungskapazitäten sowohl für γ -Tocopherol als auch für γ -Tocotrienol auf. Aus diesen Daten kann man folgern, daß die genannten Substrate entweder durch ein Enzym oder durch Enzyme mit sehr ähnlichen oder gleichen Eigenschaften umgesetzt wurden.

3.4.5.2 Kinetische Charakterisierung der γ -Tocopherolmethyltransferase

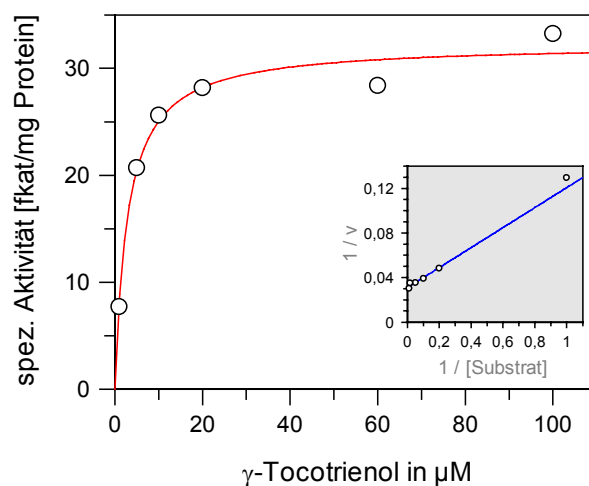
Wie in Abbildung 3-19 gezeigt, folgte die Umsatzgeschwindigkeit der γ -Tocopherolmethyltransferase in Abhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Substrate dem typischen hyperbolischen Verlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik, die sich durch die allgemeine Gleichung $v = v_{\max} * S / (K_m + S)$ ausdrücken läßt. Diese Untersuchungen wurden an Enzymextrakten nach Acetonfällung durchgeführt.

Abbildung 3-19: Michaelis-Menten-Kinetik mit integrierter Graphik der Lineweaver-Burk-Auftragung für die folgenden Substrate:

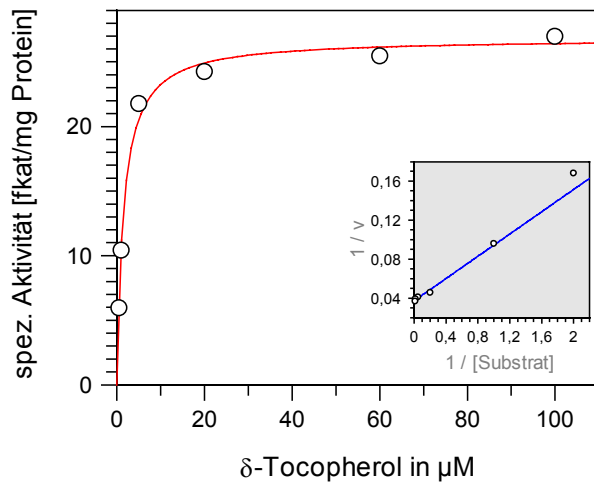
A.) γ -Tocopherol
in Gegenwart von
25 μM [^{14}C] SAM



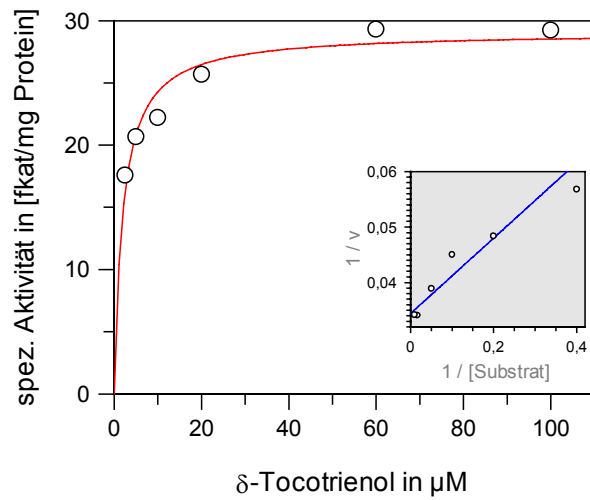
B.) γ -Tocotrienol
in Gegenwart von
25 μM [^{14}C] SAM



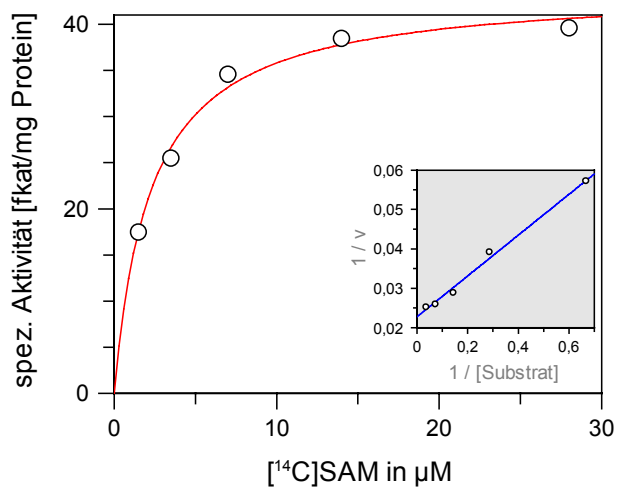
C.) δ -Tocopherol
in Gegenwart von
 $25 \mu\text{M}$ [^{14}C] SAM



D.) δ -Tocotrienol
in Gegenwart von
 $25 \mu\text{M}$ [^{14}C] SAM



E.) [^{14}C] SAM
in Gegenwart von
 $0,1 \text{ mM}$ γ -Tocopherol



Die kinetischen Konstanten K_m und v_{max} wurden zur Absicherung aus verschiedenen linearen Transformationen der Michaelis-Menten-Kinetik abgeleitet. Lineare Beziehungen wie

die nach Lineweaver Burk, Hanes-Wilkinson und Eadie-Hofstee resultieren aus der ersten Ableitung der Michaelis-Menten-Gleichung.

In Abbildung 3-20 sind am Beispiel der Methylierung von γ -Tocopherol durch die γ -TMT alle drei Methoden zur Bestimmung von K_m und v_{max} für γ -Tocopherol gegenübergestellt. Die linearen Transformationen wurden der statistischen Auswertung wie unter 2.11 unterzogen.

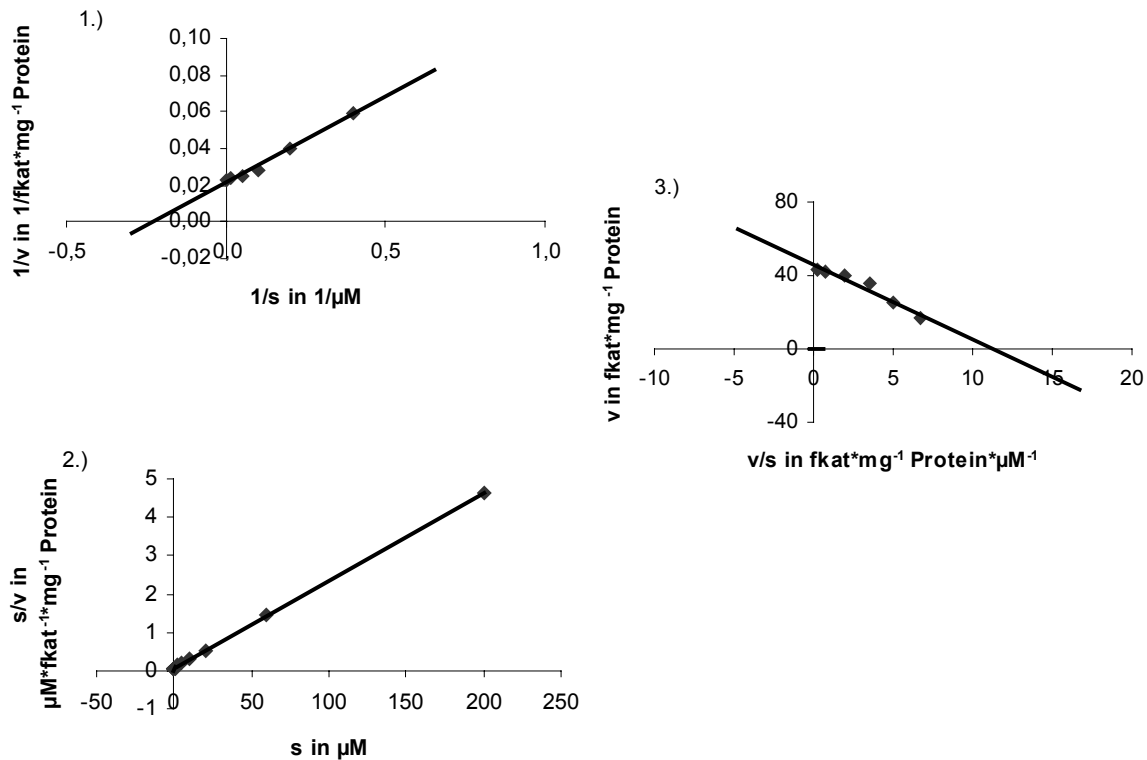


Abbildung 3-20: Methoden zur K_m - und v_{max} -Bestimmung der γ -TMT für γ -Tocopherol.

1.) Lineweaver-Burk, 2.) Hanes-Wilkinson und 3.) Eadie-Hofstee

In Tabelle 3-6 sind die Michaelis – Konstanten der γ -TMT für die verschiedenen Substrate angegeben.

Aus den K_m – Werten allein ließ sich nicht ableiten, welches Substrat bevorzugt wurde. Deshalb wurde zur weiteren Analyse der Quotient aus v_{max}/K_m verglichen. Dies ist ein Verfahren, das bei verwandten Substraten oft verwendet wird (Bisswanger, 1994). Da die spezifische Aktivität sehr von der Präparation abhängig war, wurden die Verhältnisse der v_{max}/K_m -Quotienten der unterschiedlichen Substrate für jede Präparation getrennt verglichen. Es konnte jedoch kein bevorzugtes Substrat für die γ -TMT gefunden werden, da das Verhältnis der Quotienten ungefähr eins betrug (siehe Tabelle 3-6).

<i>Substrat</i>	<i>Lineweaver Burk</i>		<i>Hanes</i>		<i>Eadie-Hofstee</i>	
	K_m	v_{max}/K_m	K_m	v_{max}/K_m	K_m	v_{max}/K_m
γ -Tocopherol	$3,8 \pm 0,7$	12,5	$3,1 \pm 0,5$	15,8	$3,6 \pm 0,3$	14,1
γ -Tocotrienol	$3,6 \pm 0,7$	11,0	$3,1 \pm 0,9$	12,4	$2,9 \pm 0,2$	11,6
δ -Tocopherol	$3,6 \pm 0,1$	15,3	$2,9 \pm 0,7$	12,8	$2,9 \pm 0,8$	16,3
δ -Tocotrienol	$2,5 \pm 0,7$	9,2	$2,7 \pm 0,5$	10,5		
[14 C]AdoMet	$3,3 \pm 0,6$		$2,0 \pm 0,4$		$2,9 \pm 0,5$	

Tabelle 3-6: Zusammenfassung der kinetischen Daten für verschiedene Substrate der γ -TMT aus roten Paprikafrüchten (Mittelwerte aus 5-6 Stichproben); Dimensionen: K_m in [μ M] und v_{max}/K_m in [fkat/mg Protein* μ M]

3.5 Kinetische Charakterisierung der γ -TMT aus Fruchtperikarp von *Capsicum annuum* der gelben Varietät

Wie schon für die rote Varietät wurden auch für die γ -TMT aus den Fruchtschalen der gelben Varietät von *Capsicum annuum* die kinetischen Parameter untersucht. Die K_m -Werte und Quotienten aus v_{max}/K_m sind in Tabelle 3-7 zusammengestellt.

Für die gelbe Varietät konnte, wie auch schon für die rote gezeigt, kein bevorzugtes Substrat für die γ -TMT gefunden werden, da auch hier das Verhältnis der Quotienten ungefähr eins betrug.

<i>Substrat</i>	<i>Lineweaver Burk</i>		<i>Hanes</i>		<i>Eadie-Hofstee</i>	
	K_m	v_{max}/K_m	K_m	v_{max}/K_m	K_m	v_{max}/K_m
γ -Tocopherol	4,9 ± 1	5,6	3,7 ± 1,7	6,4	2,6 ± 0,5	9,5
γ -Tocotrienol	4,1 ± 0,4	4,8	2,9 ± 0,4	7,5	2,0 ± 0,3	9,9
δ -Tocopherol	3,7 ± 1,0	5,1	3,9 ± 2,0	8,0	1,6 ± 0,2	9,6
δ -Tocotrienol	3,7 ± 1,0	2,4	3,9 ± 2,0	5,7	1,5 ± 0,3	7,8
[¹⁴ C]AdoMet	4,2		2,4		1,7	

Tabelle 3-7: Zusammenfassung der kinetischen Daten für verschiedene Substrate der γ -TMT aus Früchten der gelben Varietät von *Capsicum annuum*; Dimensionen: K_m in [μ M] und v_{max}/K_m in [fkat/mg Protein* μ M]

3.6 Rekombinanten γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana*

Die γ -TMT aus *Arabidopsis* wurde von der Firma SunGene (Dr. Badur) in *E.coli* überexprimiert und für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Fusionsprotein mit N-terminalem Hexahistidine-Rest, wodurch sich das Enzym mittels einer Nickel-Agarose-Säule reinigen ließ.

3.6.1 Anzucht der *E. coli*-Kultur

Die *E. coli*-Kultur wurde wie unter 2.1.3 angezogen. Die Induktion der γ -TMT wurde nach der Zugabe von 0,4 mM IPTG gestartet. Nach 2 Stunden Induktion wurde die *E. coli*-Zellen geerntet und durch Lysis (2.5.2) aufgeschlossen.

Da es anfänglich nicht möglich war, rekombinantes Protein mit reproduzierbarer spezifischer Aktivität zu produzieren, lag der Schluß nahe, daß die transformierten Bakterien das Enzym unterschiedlich stark exprimierten.

Für dieses Experiment wurden 10 Kolonien von einer Agarplatte mit transformierten Bakterien entnommen, in Einzelkulturen angezogen, induziert, geerntet und lysiert. Das Lysat wurde auf γ -TMT – Aktivitäten untersucht.

In Abbildung 3-21 sind die γ -TMT-Aktivitäten der verschiedenen Klone gezeigt. Von den 10 Klonen enthielten nur vier γ -TMT-Aktivitäten (Klon 1, 2, 5 und 7) und nur einer ausreichend hohe Aktivitäten (Klon 1). Von diesem Klon wurde eine Glycerinkultur angelegt, die

als Ausgangskultur für die Anzucht der *E. coli*-Zellen diente. Aus diesen Zellen wurde anschließend das Enzym gereinigt.

Das Ergebnis des Enzymtests konnte mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden (nicht gezeigt).

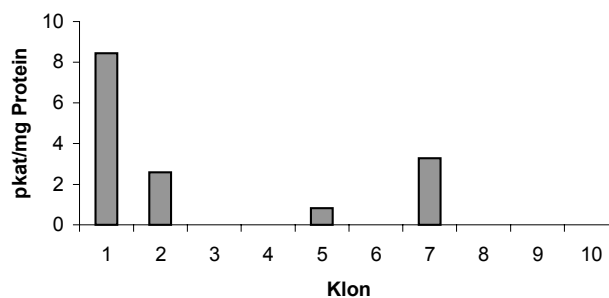


Abbildung 3-21: γ -TMT-Aktivitäten der verschiedenen Transformanten

3.6.2 Reinigung an Nickel-Agarose

Die Reinigung des rekombinanten Proteins wurde wie unter 2.5.3 beschrieben durchgeführt. In Tabelle 3-8 ist das Ergebnis der Reinigung und in Abbildung 3-22 das zugehörige Gel dargestellt.

Dem Elutions- und Auftragungspuffer wurden 5 % (v/v) Glycerin zugesetzt, da sich in Tests gezeigt hatte, daß das Enzym in Glycerinpuffer wesentlich haltbarer war. Außerdem war es möglich, das Enzym ohne Aktivitätsverlust in Glycerinpuffer bei -80°C längere Zeit zu lagern.

	Proteinmenge/Fraktion [mg]	spezifische Aktivität [pkat/mg Protein]	Totale Aktivität [nkat]
<i>Lysat</i>	250	3,1	0,8
<i>Durchlauf</i>	187	0,6	0,1
<i>Waschschritt 1: 20 mM Imidazol</i>	5	0	0
<i>Waschschritt 2: 40 mM Imidazol</i>	0	0	0
<i>Waschschritt 3: 80 mM Imidazol</i>	1	0	0
<i>Eluat 250 mM Imidazol</i>	10	84	0,8

Tabelle 3-8: Reinigungstabelle der rekombinanten γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* in *E. coli* überexprimiert

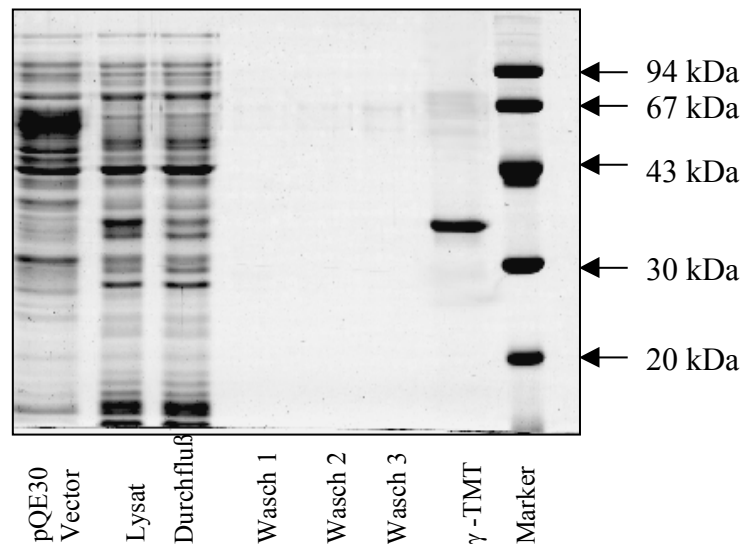


Abbildung 3-22: SDS-PAGE der Reinigung der rekombinanten γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* (20 μ g Proteinextrakt pro Bande und 5 μ g γ -TMT; Coomassie-Färbung)

Nach SDS-PAGE (Abbildung 3-22) konnte für die affinitätschromatographische gereinigten γ -TMT (inklusive Transitpeptid und Hexahistidin-Rest) ein Molekulargewicht von \approx 36 kDa kalkuliert werden.

3.6.3 pH-Abhängigkeit und pH-Stabilität

Am Mechanismus der enzymatischen Katalyse, wie der Säure-Base-Katalyse, sind in der Regel ionische Gruppen im aktiven Zentrum beteiligt, deren Protonierungszustand für die Reaktion ausschlaggebend ist. pH-Veränderungen in beide Richtungen bewirken Änderungen des Protonierungszustandes solcher Gruppen und entziehen sie damit dem katalytischen Mechanismus. Durch Aktivitätsmessungen bei variablen pH-Werten werden so Titrationskurven dieser Gruppen erhalten.

Wie in Abbildung 3-23 (innere Kurve) gezeigt, lag das pH-Optimum der γ -TMT aus *Arabidopsis* unter *in vitro*-Bedingungen bei pH 8,5. Diese Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Gemessen wurde mit vier verschiedenen Puffersystemen: bei pH 5,5 bis 6,5 in Mes-Puffer, bei pH 6,5 bis 8,0 in Kaliumphosphatpuffer, bei pH 7,5 bis 9,0 in Tris/HCl und im pH-Bereich von 9,2 bis 10,0 in Carbonat/Bicarbonat-Puffer. Bei pH 10,7 konnte keine Enzymaktivität mehr gemessen werden.

Aufgrund der polyionischen Proteinnatur von Enzymen wird deren pH-Verhalten auch durch ionische Gruppen mitbestimmt, die nicht unmittelbar am katalytischen Prozeß beteiligt

sind. Dies gilt besonders für solche Gruppen, denen wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der nativen Enzymstruktur zukommen. Während es sich bei den Protonierungen im aktiven Zentrum allgemein um reversible Vorgänge handelt, können Ladungsveränderungen an strukturerhaltenden Resten irreversible Schädigungen der nativen Struktur verursachen. Zur Unterscheidung reversibler und irreversibler pH-abhängiger Vorgänge dienen pH-Stabilitätskurven.

In Abbildung 3-23 ist die pH-Stabilitätskurve des Enzyms (äußere Kurve) gezeigt. Die Stabilitätskurve wurde erhalten, indem das Enzym in einem variablen Puffer mit entsprechendem pH-Wert über Nacht inkubiert, anschließend umgepuffert (50 mM Tris/HCl pH 8,5) und die Enzymaktivität gemessen wurde.

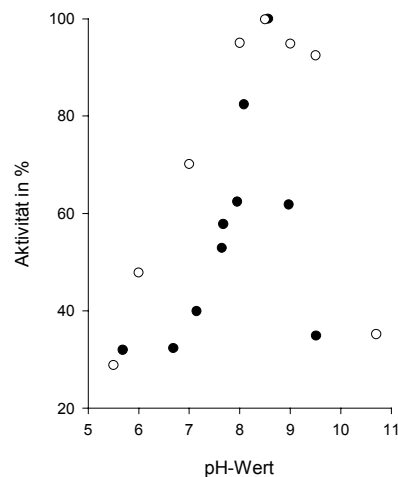


Abbildung 3-23: Innere Kurve (●): das pH-Optimum der γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* liegt in vitro bei pH 8,5. Äußere Kurve (○): die pH-Stabilitätskurve der γ -TMT ist im Bereich von pH 8 bis 9,5 stabil.

3.6.4 Temperaturabhängigkeit

Wie auch bei unkatalysierten chemischen Reaktionen steigt die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen mit der Temperatur an und zwar pro 10°C Temperaturerhöhung um einen Faktor von 2-3. Bei höheren Temperaturen beobachtet man jedoch eine Verzögerung des Anstiegs und schließlich einen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit unter Durchlaufen eines Maximums. Dieser Vorgang ist durch die metastabile Proteinnatur begründet, die bei höheren Temperaturen destabilisiert wird und schließlich irreversibel denaturiert.

Der Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der γ -TMT wurde in einem Bereich von 20 – 40°C gemessen. Das Enzym zeigte einen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur und erreichte die maximale Aktivität unter *in vitro*-Bedingungen bei 33°C (siehe Abbildung 3-24). Bei der Untersuchung wurde das Enzym direkt in eine temperierte Testmischung gegeben.

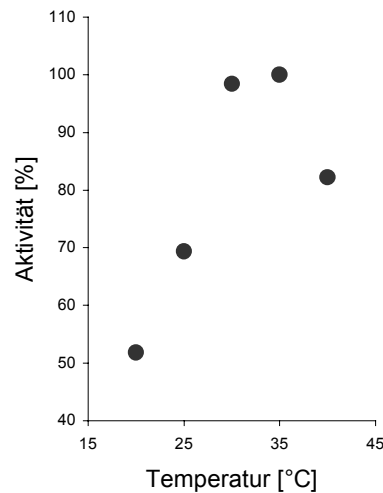


Abbildung 3-24: Temperatur-Maximum der γ -TMT aus *Arabidopsis* unter *in vitro*-Bedingungen.

3.6.5 Einfluß von Detergenzien, reduzierenden Substanzen und der Salzkonzentration auf die Enzymaktivität

3.6.5.1 Salzkonzentration

Die Löslichkeit eines Proteins im wäßrigen Milieu ist empfindlich von der Konzentration gelöster Salze abhängig. Die Salzkonzentration wird im Allgemeinen in der Form der Ionenstärke angegeben.

Um die günstigste Pufferkonzentration zu bestimmen, wurden im Assay verschiedene Pufferkonzentrationen (10 bis 250 mM) untersucht (siehe Abbildung 3-25). Wie man der Graphik entnehmen kann, wurde die Enzymaktivität im gewählten Pufferbereich nicht beeinflusst.

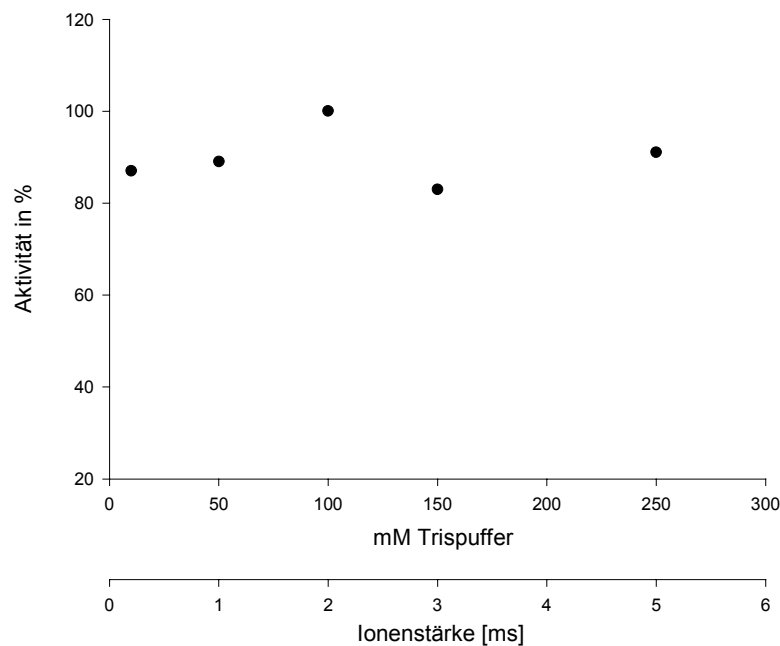


Abbildung 3-25: Einfluß der Ionenstärke auf die Enzymaktivität.

Zweiwertige Ionen, z.B. Mg^{2+} und Ca^{2+} , erhöhen die Löslichkeit von Proteinen und salzen sie nicht aus. Diese Ionen können so stabilisierend wirken, sie können aber auch zur Denaturierung beitragen.

Im Folgenden wurde der Einfluß zweiwertiger Ionen wie Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} bei verschiedenen Konzentrationen (1 bis 40 mM) auf die Enzymaktivität im Testansatz untersucht (siehe Abbildung 3-26). Aus der Graphik ist ersichtlich, daß sich Mg^{2+} -Ionen nicht wesentlich auf die Enzymaktivität auswirkten. Ca^{2+} -Ionen hemmten mit zunehmender Konzentration die γ -TMT-Aktivität, so daß man bei einer Konzentration von 40 mM nur noch ca. 70% der ursprünglichen Aktivität messen konnte. 1 mM Zn^{2+} -Ionen im Ansatz verringerten die Enzymaktivität um 50%. Ab 5 mM Zn^{2+} konnte keine Aktivität mehr verzeichnet werden. Mn^{2+} -Ionen hatten bei einer Konzentration von 1 mM keinen wesentlichen Einfluß auf die Enzymaktivität. Bei höheren Mn^{2+} -Konzentrationen nahm sie sprunghaft ab und war ab 5 mM wie in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen nicht mehr detektierbar.

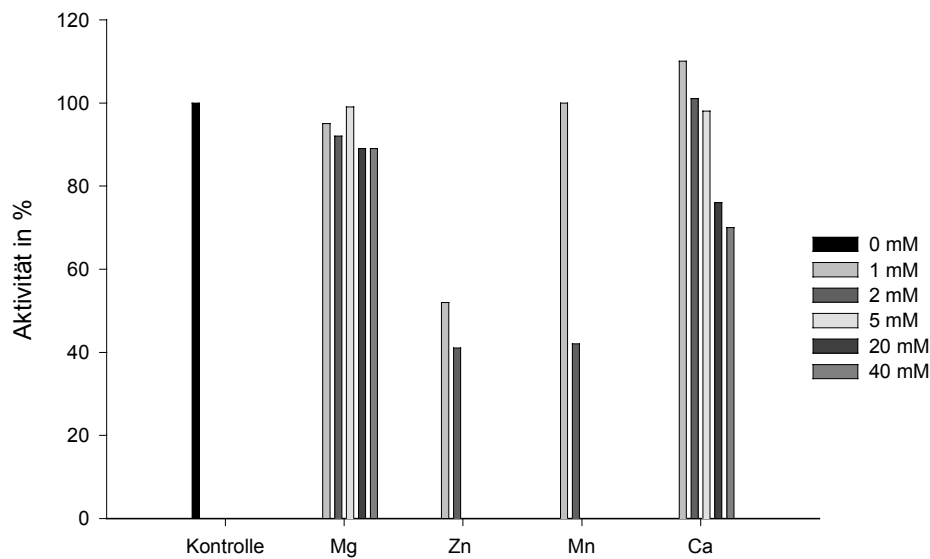


Abbildung 3-26: Einfluß von zweiwertigen Ionen auf die γ -TMT Aktivität im Assay

Da die zweiwertigen Ionen keine Wirkung bzw. nur einen hemmenden Einfluß auf die Enzymaktivität hatten, wurde der Einfluß von EDTA untersucht. EDTA („Komplexon“) ist ein sechszähliger organischer Ligand, der in der Lage ist, mit Erdalkali-Ionen einen stabilen Chelat-Komplex zu bilden. Der Versuch sollte zeigen, ob es sich ausschließlich um gemessene Ioneneffekte handelte oder ob zweiwertige Ionen aus Verunreinigungen von Puffersubstanzen einen Einfluß hatten. Hierzu wurden dem Meßansatz verschiedene EDTA-Konzentrationen (0,5, 1, 2, 5 und 10 mM) zugesetzt und die Enzymaktivität gemessen (Kontrolle: Ansatz ohne EDTA). Die Enzymaktivität wurde aber in keiner Weise beeinflusst, so daß man sagen kann, daß die gemessenen Effekte allein auf Ionen und nicht auf additive Effekte durch Pufferverunreinigungen zurückzuführen waren.

3.6.5.2 Detergenzien und reduzierende Substanzen

Da es sich bei Vitamin E um lipidlösliche Substanzen handelt, wurde der Einfluß von Detergenzien im Meßansatz untersucht. Bei den Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß der Einsatz von 0,5 % CHAPS die Enzymaktivität um ca. 30 %, bezogen auf den Ansatz ohne CHAPS, erhöhte.

Weiterhin wurde auch der Einfluß von reduzierenden Substanzen auf die Enzymaktivität untersucht, da es sich bei den Tocopherolen bzw. Tocotrienolen um Antioxidantien han-

delt, welche leicht zur Oxidation neigen. Aus den Experimenten konnte gefolgert werden, daß der Einsatz von 5 mM DTT die enzymatische Aktivität um ca. 30 – 35 % erhöhte.

Aufgrund der Ergebnisse wurden dem Meßansatz 0,5 % CHAPS und 5 mM DTT zugesetzt.

3.6.6 Stabilisierung der γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana*

Sobald man ein Protein aus seiner natürlichen Umgebung entfernt, ist es vielen Agenzien ausgesetzt, die es irreversibel schädigen können. Die in den Zellen vorhandenen Proteasen konnten mittels eines Protease-Cocktails („Complete EDTA-free“; Firma Roche) inaktiviert werden. Das Enzym konnte dadurch stabilisiert werden.

Unter anderem stellte sich das Problem der Stabilität während der Lagerung des gereinigten Enzyms. Dazu wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Als erstes wurde das Enzym in verschiedenen Puffern mit und ohne Zusätze bei verschiedenen Temperaturen eingefroren (siehe Abbildung 3-27).

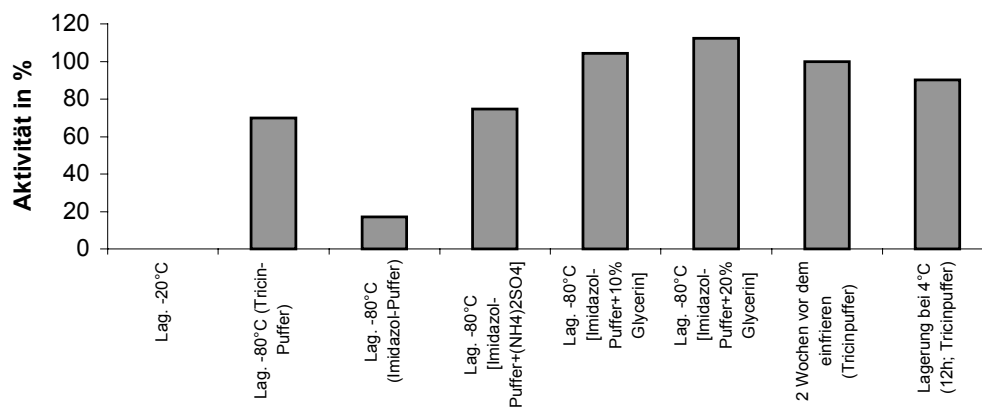


Abbildung 3-27: Einfluß verschiedener Puffer, Zusätze und Temperaturen auf die Enzymaktivität

Wie Abbildung 3-27 zu entnehmen ist, führte die Lagerung bei -20°C zu vollständigen Aktivitätsverlust. Das Imidazol-Puffersystem eignete sich nicht zur Lagerung bei -80°C . In Tricinpuffer bei pH 7,5 ließ sich das Enzym mit geringen Aktivitätsverlusten lagern. Außerdem ist der Graphik zu entnehmen, daß Zusätze zum Reinigungspuffer vor der Lagerung das Enzym beim Einfrieren stabilisierten. Da der Zusatz von Glycerin sich positiv auswirkte,

wurden weitere Experimente mit Glycerin im optimiertem Puffersystem (50 mM Tris/HCl, pH 8,5) bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (siehe Abbildung 3-28).

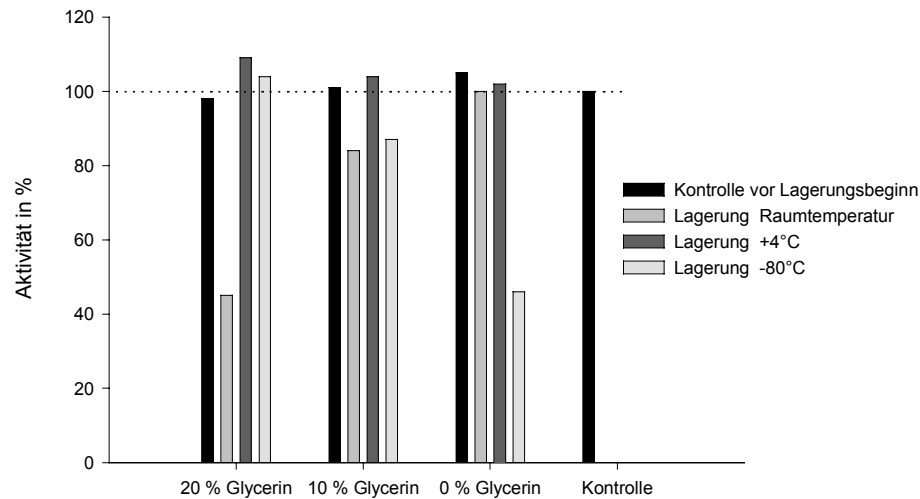


Abbildung 3-28: Lagerung der γ -TMT bei verschiedenen Temperaturen und Glycerinkonzentrationen.

Die Lagerung der γ -TMT in 10 % (v/v) zeigte bei den drei untersuchten Temperaturbedingungen den geringsten Aktivitätsverlust. Bei -80°C und bei Raumtemperatur konnte das Enzym mit weniger als 10 % Aktivitätsverlust gelagert werden. Aus diesem Grund wurde für die Lagerung des Enzyms ein Tris/HCl-Puffer von pH 8,5 mit 10 % Glycerin verwendet.

3.6.7 Abhängigkeit der γ -TMT-Aktivität von der Proteinmenge und der Zeit

In den nachstehenden Abbildungen ist die Abhängigkeit der γ -TMT von der eingesetzten Proteinmenge (Abbildung 3-29) und der Inkubationszeit (Abbildung 3-30) aufgezeigt. Die Versuche wurden mit dem rekombinanten Enzym durchgeführt.

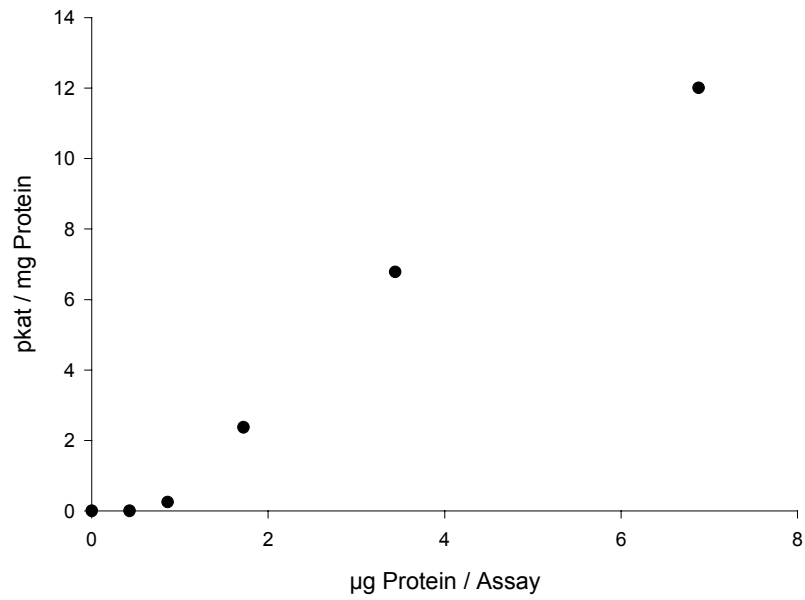


Abbildung 3-29: Bildung von α -Tocopherol durch die rekombinante γ -TMT bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.

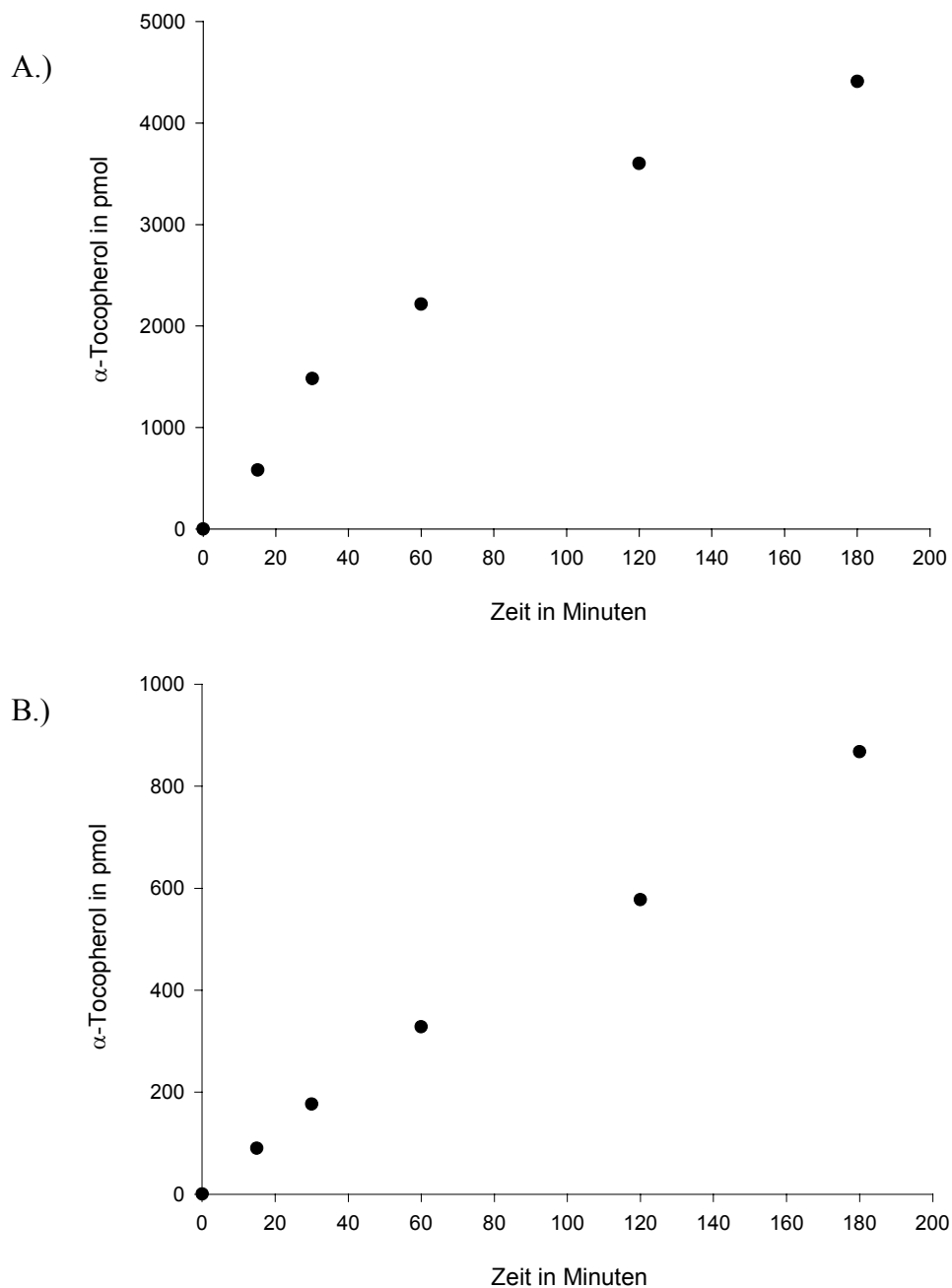


Abbildung 3-30: Zeitabhängige Bildung von α -Tocopherol durch die rekombinante γ -TMT bei zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen (A: 10 μ g Protein; B: 1 μ g Protein).

Aus den Untersuchungen zur Optimierung der Proteinkonzentration kann man schließen, daß die Reaktionszeit für γ -Tocopherol nicht mehr als 2 h betragen sollte. Es wurden Proteinkonzentration zwischen 1 bis 4 μ g Protein im Testansatz gewählt. Diese Messungen dienen als Anhaltspunkt für die kinetischen Untersuchungen. Da das Enzym aber nicht immer in der gleichen spezifischen Aktivität vorhanden war, wurden vor jeder kinetischen Un-

tersuchung Zeit- und Proteinkonzentrationsprofile neu untersucht, um so reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

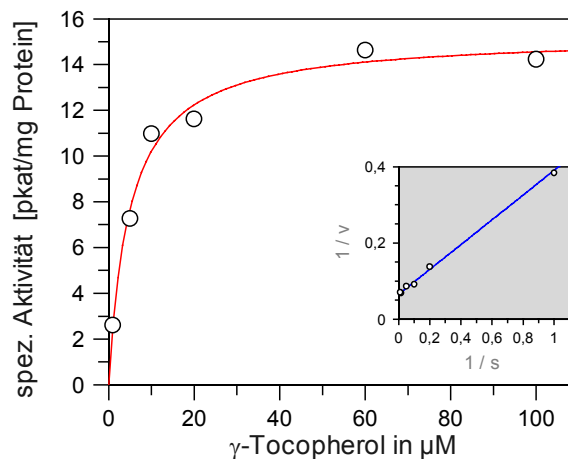
3.6.8 Substratspezifität und kinetische Charakterisierung der rekombinanten γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana*

In diesem Experimentteil wurde untersucht, welche Substrate von der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* umgesetzt wurden. Getestet wurden γ -Tocopherol, β -Tocopherol und δ -Tocopherol sowie die entsprechenden Tocotrienole. SAM diente bei diesen Reaktionen als Methyl donor. Außerdem erfolgte für alle Substrate eine umfangreiche kinetische Charakterisierung.

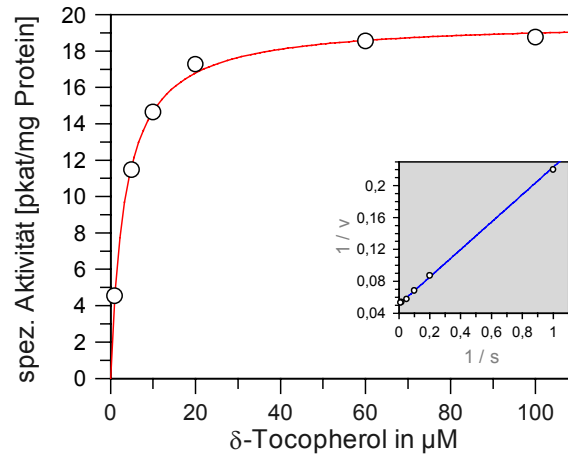
Die γ -TMT akzeptierte γ - und δ -Tocopherol nicht aber β -Tocopherol und die drei Tocotrienole (γ , δ und β) als Substrat.

Abbildung 3-31: Michaelis Menten-Kinetiken der rekombinanten γ -TMT aus *Arabidopsis* mit integrierter Graphik der Lineweaver-Burk-Auftragung für folgende Substrate:

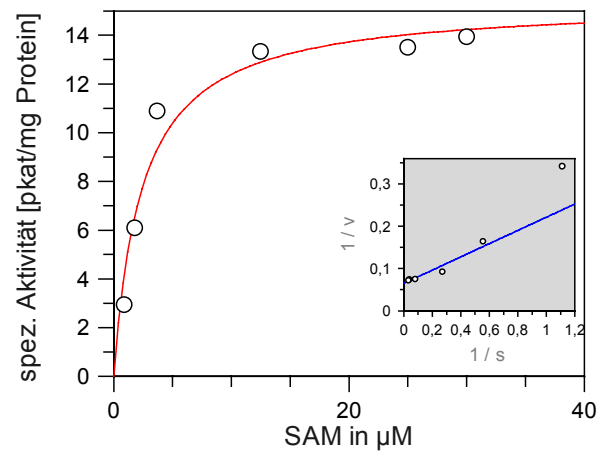
A.) γ -Tocopherol
in Gegenwart von 25 μ M
AdoMet



B.) δ -Tocopherol
in Gegenwart von 25 μM
AdoMet



C.) AdoMet
in Gegenwart von 50 μM
 γ -Tocopherol



Die Untersuchungen der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration der verschiedenen Substrate zeigten für das rekombinante Enzym das typische Bild von Michaelis-Menten-Kinetiken.

Aus diesem Grunde wurden, wie schon für die γ -TMT aus Paprika, zur Bestimmung der K_m - und v_{max} -Werte die linearen Transformationen nach Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee verwendet. Die linearen Transformationen nach Lineweaver-Burk sind als kleine Graphiken in die Michaelis-Menten-Kinetiken eingefügt.

Eine Zusammenfassung der K_m - und v_{max} -Werte ist in Tabelle 3-9 gegeben.

<i>Substrat</i>	<i>Lineweaver Burk</i>		<i>Hanes</i>		<i>Eadie-Hofstee</i>	
	K_m	v_{max}	K_m	v_{max}	K_m	v_{max}
γ -Tocopherol	4,9 ± 0,7	14,7 ± 1,2	5,4 ± 0,6	14,5 ± 1,2	4,5 ± 0,6	14,2 ± 1,2
δ -Tocopherol	4,2 ± 0,9	23,3 ± 4,5	3,3 ± 0,5	21,5 ± 3,0	3,9 ± 0,6	22,6 ± 3,7
SAM	3,5 ± 0,9	15,1 ± 3,3	5,2 ± 1,4	18,7 ± 1,1	5,9 ± 0,8	15,3 ± 1,1

Tabelle 3-9: Zusammenfassung der K_m - und v_{max} -Werte für die rekombinante γ -TMT; Dimensionen: K_m in [μ M] und v_{max} in [pkat/mg Protein]

Da sich, wie schon bei der γ -TMT aus Paprika, die K_m -Werte für γ - und δ -Tocopherol nur unwesentlich unterscheiden, wurde die Frage nach dem bevorzugten Tocopherol-Substrat aus dem Verhältnis der v_{max}/K_m -Werte abgelesen. In der nachstehenden Tabelle sind v_{max}/K_m -Werte für die beiden Substrate aufgeführt.

<i>Substrat</i>	<i>Lineweaver Burk</i>	<i>Hanes</i>	<i>Eadie-Hofstee</i>
	v_{max}/K_m	v_{max}/K_m	v_{max}/K_m
	[pkat/mg Protein* μ M]	[pkat/mg Protein* μ M]	[pkat/mg Protein* μ M]
γ -Tocopherol	3,0	2,7	3,2
δ -Tocopherol	5,6	6,5	5,8

Tabelle 3-10: v_{max}/K_m -Quotienten für γ - und δ -Tocopherol

Das Verhältnis der Quotienten von δ - zu γ -Tocopherol ist ungefähr zwei, was für eine Bevorzugung von δ -Tocopherol als Substrat der rekombinanten γ -TMT spricht.

3.6.9 Reaktionsmechanismus der rekombinanten γ -TMT

Bei der in dieser Arbeit betrachteten Reaktion sind für die Produktbildung zwei Substratmoleküle notwendig. Bei den Substratmolekülen handelt sich um einen Tocopherolderivat (γ - bzw. δ -Tocopherol) und S-Adenosyl-L-methionin. Die Enzymreaktion ist in Abbildung 3-32 dargestellt.

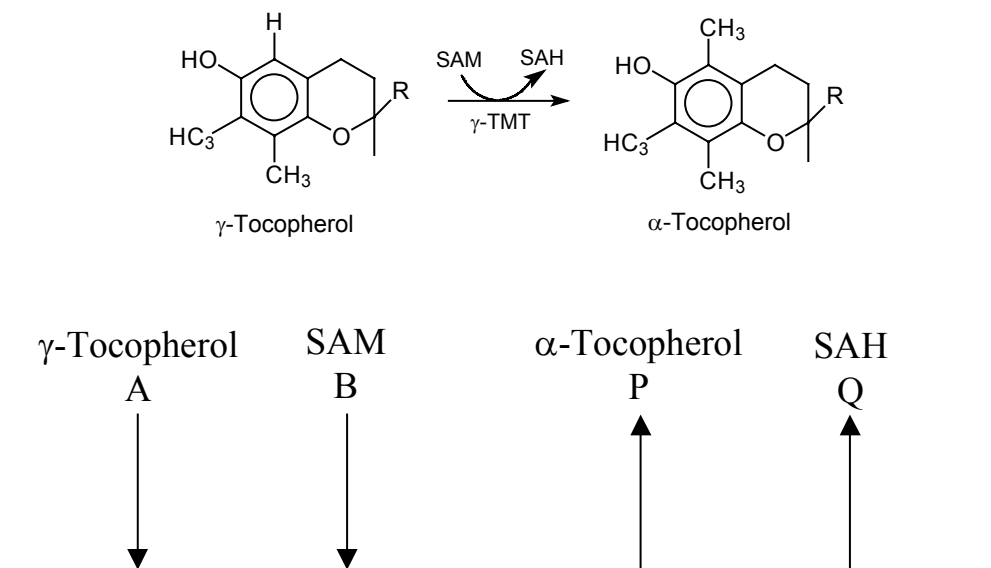


Abbildung 3-32: Mechanismus der Enzymreaktion der $\gamma\text{-TMT}$ und allgemeines Reaktionsverlaufschaema für eine Mehrsubstratreaktion (Cleland 1963)

Werden die Reaktionsprodukte einer Enzymreaktion aus zwei verschiedenen Substraten A und B gebildet, so sind mehrere Reaktionsmechanismen möglich, die sich durch ihr kinetisches Verhalten unterscheiden lassen. Beim sequentiellen Mechanismus erfolgt die Produktbildung, nachdem beide Substrate A und B an das Enzym gebunden sind, also aus dem ternären Komplex EAB heraus (E steht für die $\gamma\text{-TMT}$). Ist die Reihenfolge der Bindung von A und B beliebig, so bezeichnet man den Mechanismus als Zufallsmechanismus (Random Bi Bi-Mechanismus). Ist aber die Reihenfolge der Bindung der Substrate A und B an das Enzym festgelegt, so bezeichnet man diesen Mechanismus als geordneten Bi Bi-Mechanismus (Ordered Bi Bi-Mechanismus). Ein weiterer Mechanismus, der sich prinzipiell von den vorgenannten unterscheidet, ist der sogenannte Ping-Pong-Mechanismus. Bei diesem Mechanismus gibt es zwei stabile Enzymformen E und E'. Das Substrat A bildet mit der Enzymform E einen Enzym-Substrat-Komplex, der unter Bildung des Reaktionsproduktes P in die Enzymform E' gespalten wird. Das Substrat B kann nur mit dieser Enzymform E' einen Enzym-Substrat-Komplex E'B bilden, der dann in das Reaktionsprodukt Q unter Rückbildung der Enzymform E gespalten wird. Durch kinetische Messungen ist es möglich, zwischen einem sequentiellen und einem Ping-Pong-Mechanismus zu unterscheiden. Am geeignetsten ist dabei die abgeleitete reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk.

In Abbildung 3-33 sind die reziproken Auftragungen für beide Substrate A und B gezeigt.

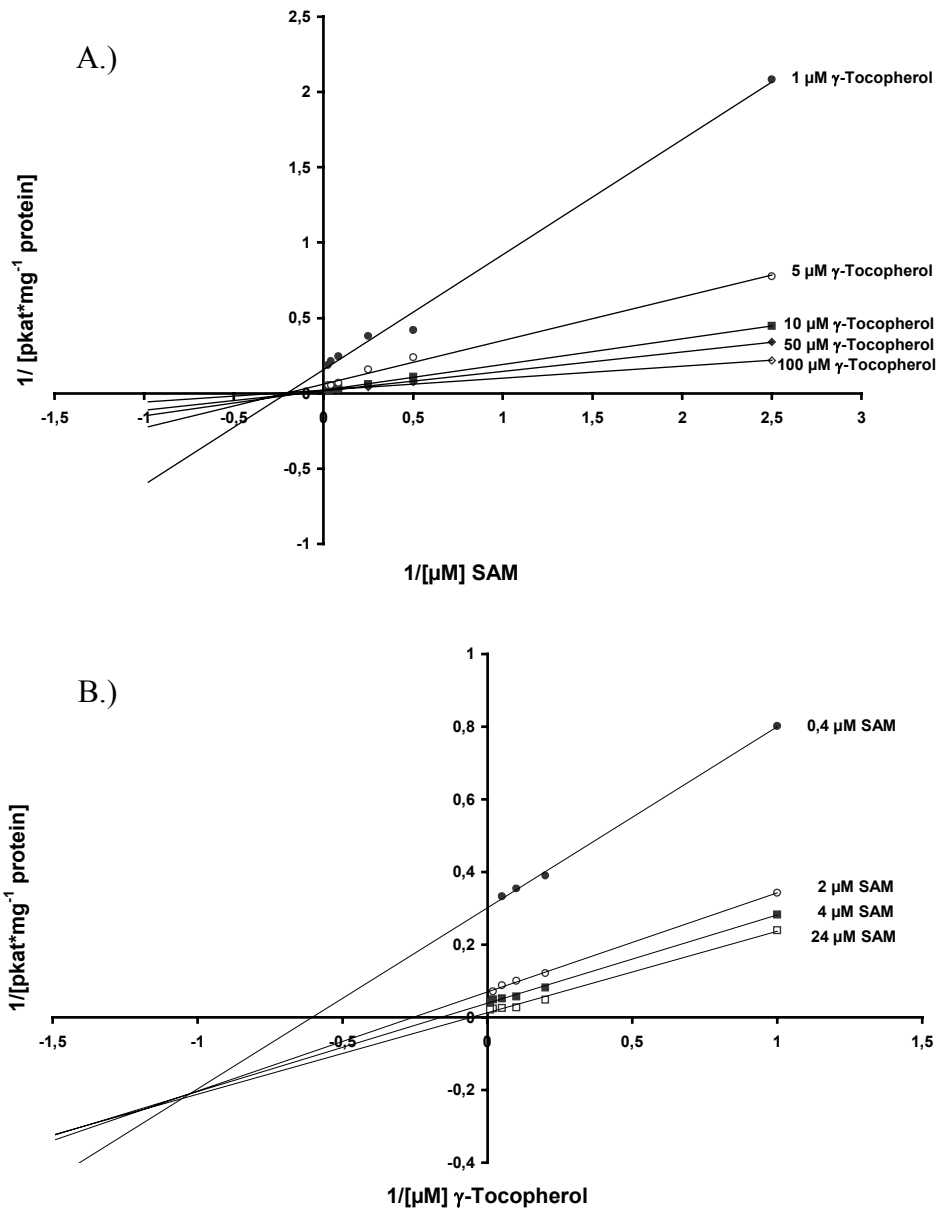


Abbildung 3-33: Lineweaver-Burk-Auftragung für die Zweisubstratreaktion der γ -TMT; A.) γ -Tocopherol variabel und 25 μM SAM; B.) SAM variabel und 50 μM γ -Tocopherol

Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, handelt es sich um einen sequentiellen Reaktionsmechanismus für die γ -TMT. Um zu entscheiden, was für eine Art von sequentiell Mechanismus vorliegt, mußte die Produktinhibierung näher untersucht werden.

Wie man weiß, können Enzyme in ihrer Wirksamkeit auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden. Diesen Umstand nutzt die lebende Zelle zur Regulation der Enzymaktivitäten. Die Enzymaktivität kann durch spezifisch an definierte (katalytische oder regulatorische)

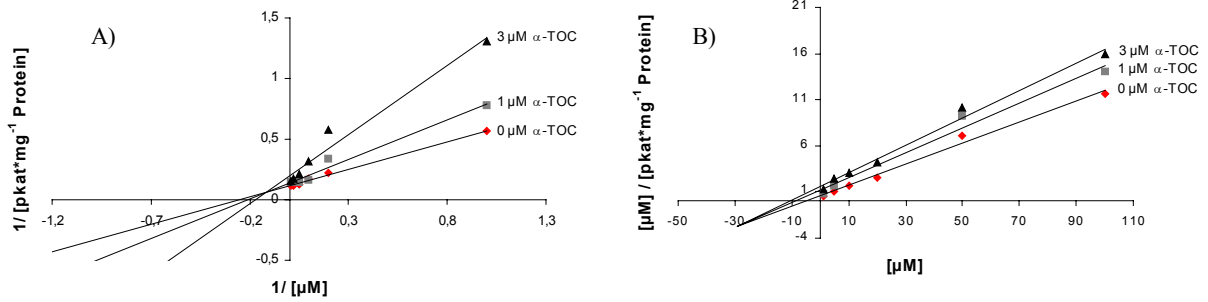
Zentren bindende Liganden-Hemmstoffe oder Inhibitoren negativ beeinflusst werden. Eine Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeiten, welche durch die Wechselwirkungen mit hydrophoben Verbindungen, Detergenzien oder chaotropen Stoffen, wie Ammoniumsulfat, verursacht wird, fällt nicht unter den Begriff der Enzymhemmung. Im allgemeinen unterscheidet man drei Hemmtypen: die Kompetitive, die Nicht Kompetitive und die Unkompetitive Hemmung.

In diesem Abschnitt wurde die Produktinhibierung der γ -Tocopherolmethyltransferase durch die Produkte S-Adenosylmethionin und α -Tocopherol untersucht (Abbildung 3-32). Die Enzymreaktion wurde aus meßtechnischen Gründen unter nicht sättigenden Substratbedingungen durchgeführt (Konstante Substratkonzentrationen: 50 μ M γ -Tocopherol und 25 μ M S-Adenosylmethionin).

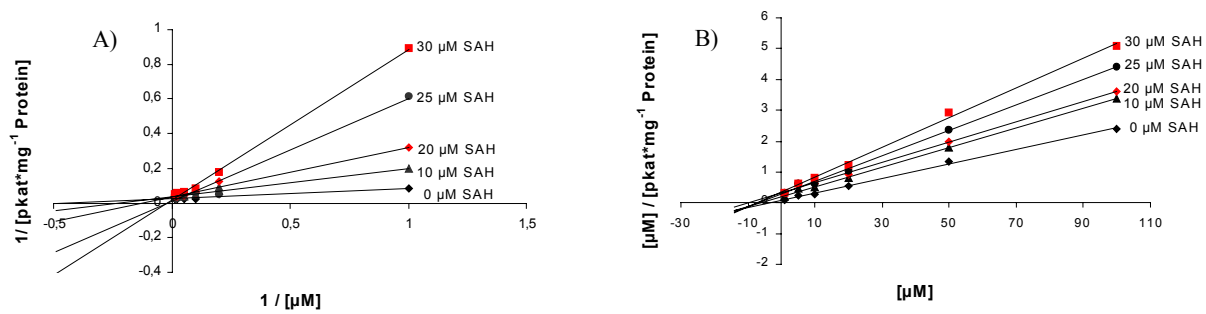
Um zu klären, welcher Reaktionsmechanismus bei der rekombinanten γ -TMT zugrunde liegt, wurden alle vier Substrat–Inhibitor–Variationen getestet. Die Abbildung 3-34 zeigt die graphischen Darstellungen (A: Lineweaver-Burk; B: Hanes) für alle vier Inhibierungsvarianten. Bei allen vier Varianten wurde das Bild einer Nicht Kompetitiven Hemmung erhalten (Tabelle 3-11). Da unter nichtsättigenden Substratbedingungen gearbeitet wurde, kann nach Bisswanger (1994) für den Reaktionsmechanismus ein Iso-Ordered Bi Bi-Mechanismus angenommen werden. Die veränderte Produkthemmung verglichen mit dem Ordered Bi Bi-Mechanismus ist durch die Isomerisierung des Enzyms im zentralen Komplex begründet.

Abbildung 3-34: Lineweaver Burk- (A) und Hanes-Diagramm (B) für die Produkthemmung der γ -TMT durch α -Tocopherol (I) und durch S-Adenosylhomocystein (II), wobei von den beiden Substraten entweder die Konzentration von γ -Tocopherol (a) oder von SAM (b) variiert wurde. Die Konzentration der Inhibitoren in μM ist in den Graphiken angegeben.

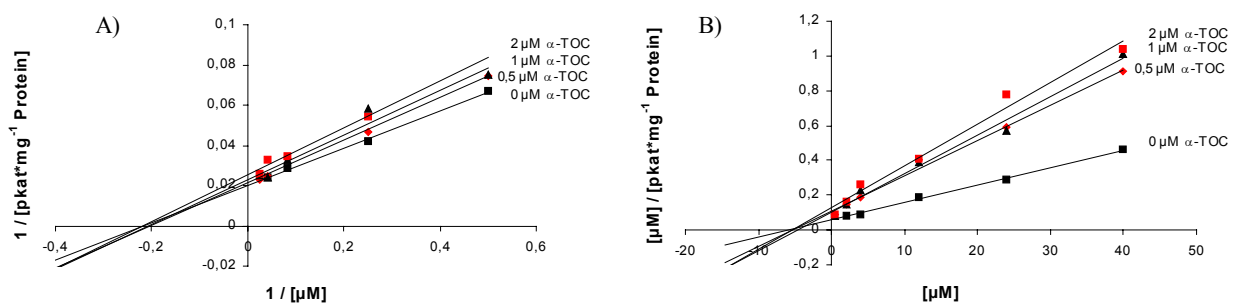
I a)



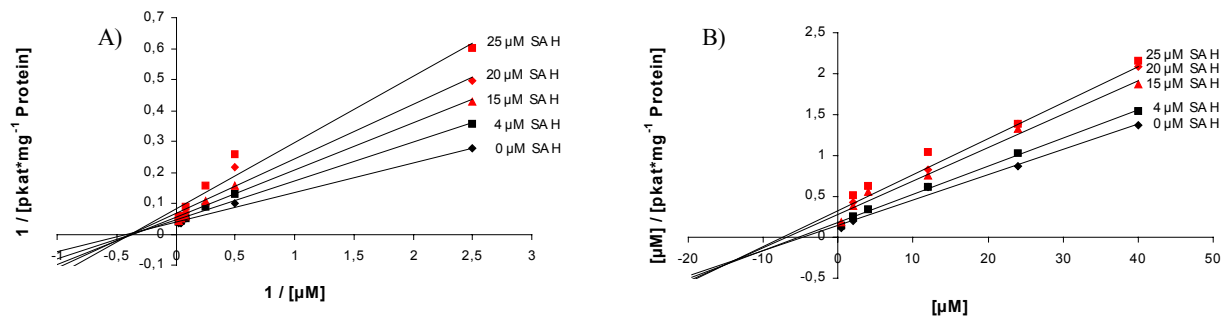
II a)



I b)



II b)



Variables Substrat	Fixiertes Substrat	Inhibitor	Muster	K_i
γ -Tocopherol	SAM	SAH	Nicht Kompetitiv	15
γ -Tocopherol	SAM	α -Tocopherol	Nicht Kompetitiv	7
SAM	γ -Tocopherol	SAH	Nicht Kompetitiv	26
SAM	γ -Tocopherol	α -Tocopherol	Nicht Kompetitiv	11

Tabelle 3-11: Produktinhibierungsanalyse für die γ -TMT

3.7 γ -TMT-Antisense bei *Arabidopsis thaliana*

Das Ziel der Untersuchungen der γ -TMT-Antisense-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* war den Einfluß des erhöhten γ -Tocopherolspiegels, der durch die Antisens-Wirkung entsteht, auf die Gesamttocopherol-Biosynthese zu untersuchen.

Von der Firma SunGene (Dr. Marcus Ebnet) wurden Antisense-Pflanzen der γ -Tocopherolmethyltransferase für Tocopherol-Untersuchungen zur Verfügung gestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde in diesen Pflanzen der Gesamttocopherolgehalt, α - und γ -Tocopherol und das Verhältnis von α - zu γ -Tocopherol bestimmt.

3.7.1 Pflanzen der F1-Generation

Bei der F1-Generation handelt es sich um eine heterozygote Generation. Von diesen wurden die Linien 218-b und SG 19 auf die genannten Parameter hin untersucht.

In Abbildung 3-35 ist der α - und γ -Tocopherolgehalt, das Verhältnis von α - zu γ -Tocopherol und der Gesamttocopherolgehalt der Linie 218-b aufgezeigt. Es wurden sieben Pflanzen mit einem kleineren α/γ -Tocopherol-Verhältnis als im Wildtyp selektiert. Es handelte sich dabei um die Pflanzen mit der Nummer 2, 4, 5, 10, 12, 14 und 25. Diese Pflanzen

sollten in der F2-Generation weitergehend untersucht werden, um die Frage zu klären, ob es sich um γ -Tocopherolmethyltransferase-Phänotypisch stabile Pflanzen handelte.

Aus der Antisense-Linie SG 19 konnte keine Pflanze mit einem verringerten α -Tocopherol-Level in Vergleich zum Wildtyp selektiert werden.

3.7.2 Pflanzen der F2-Generation

Die F2-Generation wurde wie die F1-Generation auf ihre α - und γ - Tocopherolverteilung und den Gesamttocopherolgehalt untersucht. Hierzu wurden von jeder Linie fünf Pflanzen geerntet und auf die zuvor erwähnten Parameter hin untersucht.

Da die Pflanzen im Wachstum sehr inhomogen waren, wurden pro Pflanze zwei Proben genommen.

In den nachstehenden Abbildungen (Abbildung 3-35 bis Abbildung 3-38) sind die α - und γ - Tocopherolverteilung und der Gesamttocopherolgehalt der verschiedenen Linien gezeigt.

Bei den Untersuchungen hat sich gezeigt, daß die Pflanzen der F1-Generation heterozygot waren. Die Antisensewirkung war bei den Nachkommen der Pflanzen 4, 12 und 20 nicht mehr nachweisbar. Die Nachkommen der Pflanzen 10, 14 und 25 zeigten noch eine schwache Antisensewirkung. Bei den Nachkommen der Pflanze 5 konnte kein α -Tocopherol mehr nachgewiesen werden. Deshalb handelte es sich bei den Nachkommen der Linie 218-b-5 um Pflanzen mit Antisenswirkung. Der Gesamttocopherol-Spiegel hatte sich im Vergleich zum Wildtyp aber nicht verändert, was darauf hinweist, daß α -Tocopherol keine Feedback-Reaktion auf die Gesamttocopherol-Biosynthese ausübt.

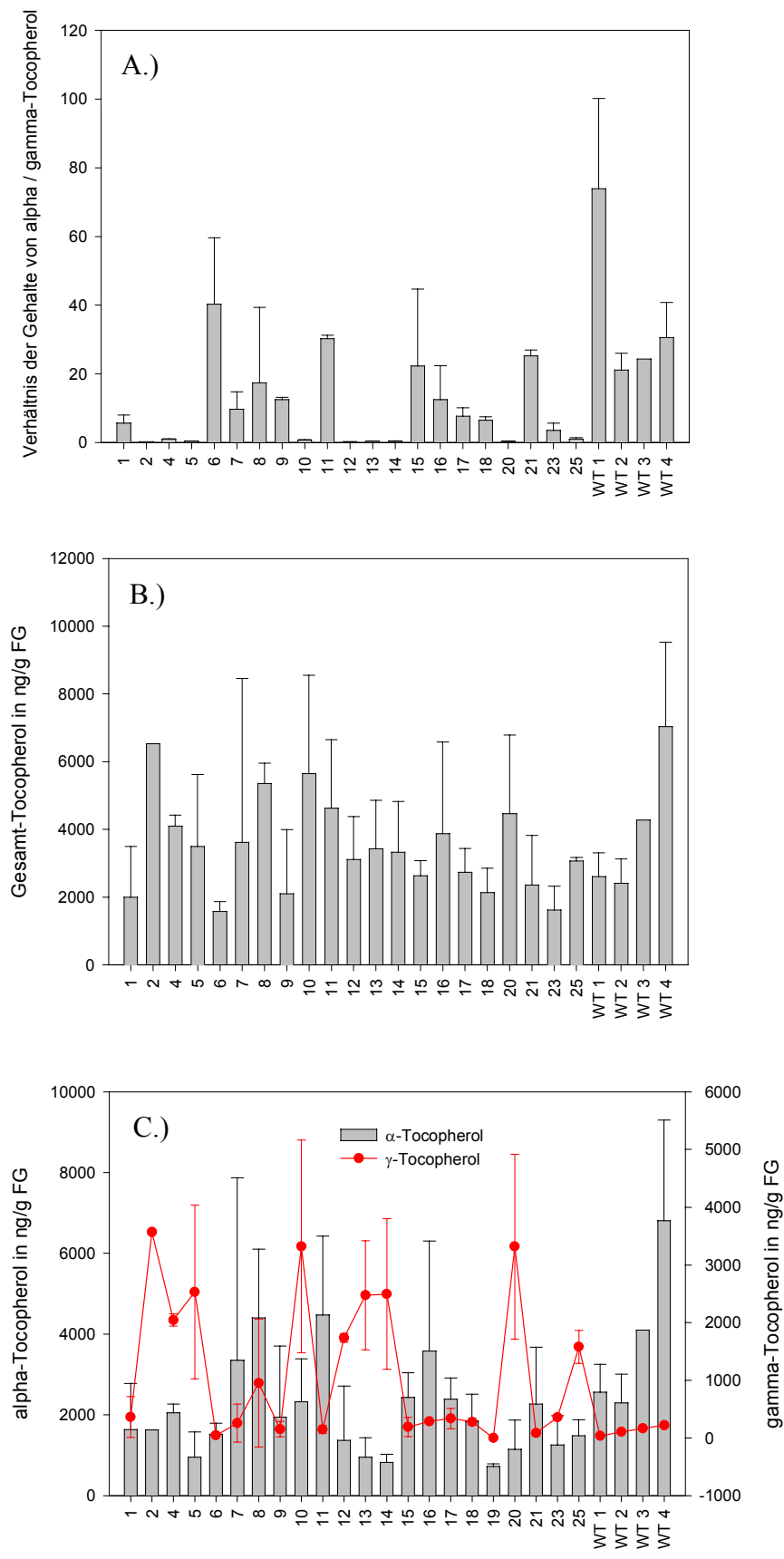


Abbildung 3-35: F1-Generation der Antisens-Pflanzen der Arabidopsis-Linie 218-b: A: Verhältnis α/γ -Tocopherol; B: Gesamttocopherolgehalt; C: α - und γ -Tocopherolverteilung

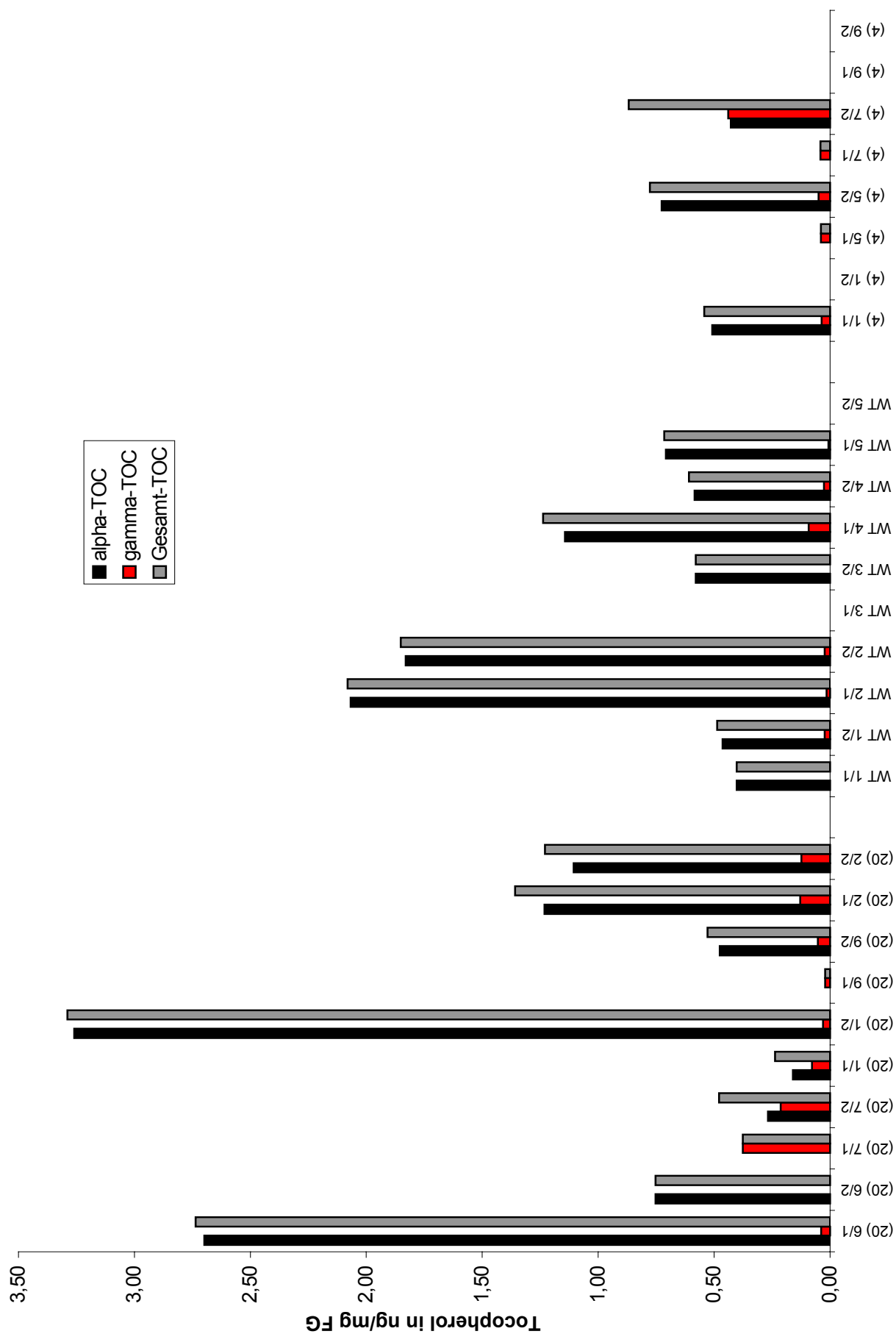


Abbildung 3-36: α - und γ -Tocopherolverteilung und Gesamt-tocopherolgehalt der Linien 218-b-(20), -(4) im Vergleich zum Wildtyp

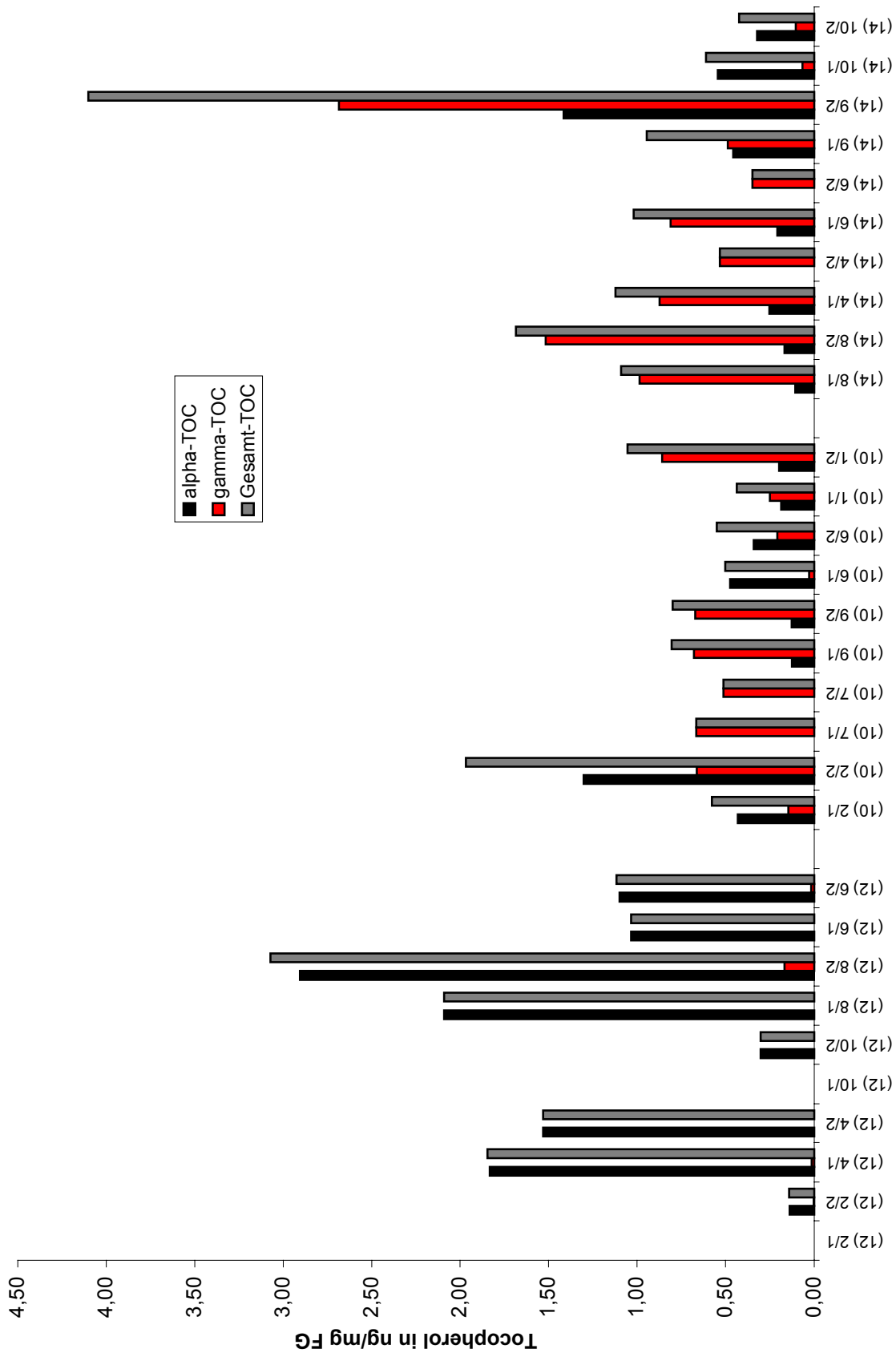


Abbildung 3-37: α - und γ -Tocopherolverteilung und Gesamt-tocopherolgehalt der Linien 218-b-(12), -(10) und -(14)

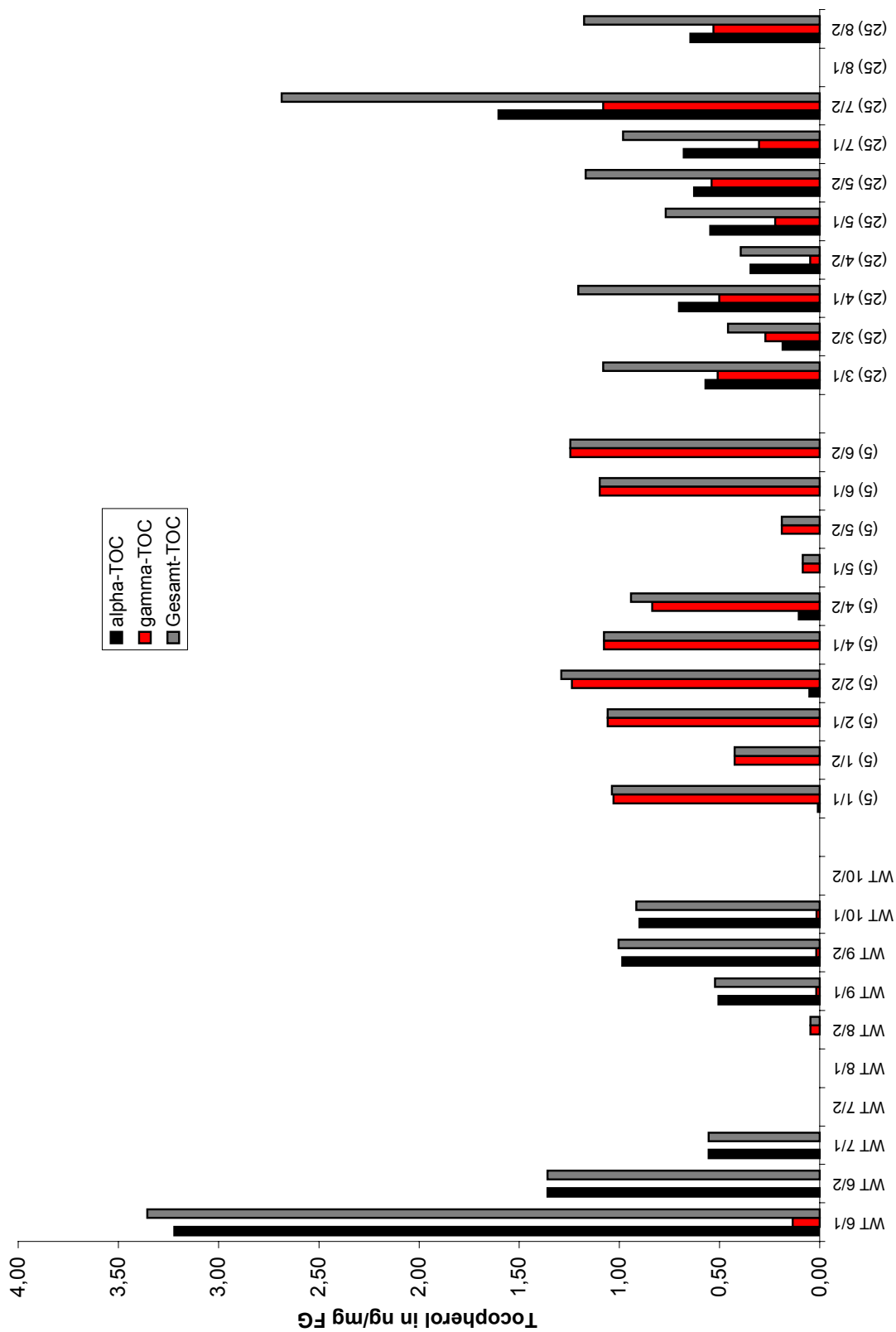


Abbildung 3-38: α - und γ -Tocopherolverteilung und Gesamt-tocopherolgehalt der Linien 218-b-(5), -(25) im Vergleich zum Wildtyp

4 Diskussion

Die Tocopherole sind eine Klasse von lipidlöslichen Antioxidantien, welche essentielle Bestandteile der menschlichen Nahrung sind. Aufgrund der antioxidativen Wirkung wird Tocopherol in der Medizin bei Krankheiten, die durch reaktive Sauerstoff-Spezies ausgelöst werden können (Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und durch Alterung bedingte Krankheiten wie z. B. Arthritis), verabreicht.

Vitamin E kommt in tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Organismen vor, kann aber nur von Photosynthese betreibenden Organismen gebildet werden (McLaughlin 1979, Hess 1993).

Seit der Isolierung des Vitamin E aus Weizenkeimöl wurde mittels der zur Verfügung stehenden biochemischen und molekularbiologischen Methoden das Vorkommen, die Wirkungsweise und Biosynthese des Vitamin E näher beschrieben.

Über die Enzyme des Tocopherolsyntheseweges bzw. deren Eigenschaften liegen zur Zeit nur ungenügende Informationen vor.

4.1 Zusammenhang zwischen Tocopherol- und Lipidgehalt

Da in der Literatur methodisch bedingte widersprüchliche Angaben über die Tocopherolgehalte verschiedener Organismen aus dem Reich der Höheren Pflanzen und Algen vorlagen, wurden Organismen, die für die weitere Arbeit von Interesse waren, mit einer einheitlichen Methodik auf ihre Tocopherolgehalte hin neu untersucht. Es wurde festgestellt, daß Samen oft γ -Tocopherol, grüne Blätter und Algen vorwiegend α -Tocopherol akkumulieren (siehe Kapitel 3.1).

Wie in den Tabellen 3-1 und 3-3 dargestellt, ist die Akkumulation der Carotinoide im Paprika-Perikarp von ansteigenden Tocopherol- und Triacylglyceridgehalten begleitet, wobei in den Triacylglyceriden gleichzeitig der Anteil an ungesättigten Fettsäuren wie Linol- (20-50%) und Linolensäure (15-25%) zunimmt. Die Tocopherolzusammensetzung ist durch hohe α -Tocopherolkonzentrationen (80-90%) und niedrige Gehalte von β - (<20%) und γ -Tocopherol (bis zu 3%) gekennzeichnet. Mit der Abnahme des Gesamttocopherols im Gewebe nehmen auch die Gehalte an β - und γ -Tocopherol ab. Wie schon Camara und Monèger (1977 und 1983) beschrieben, steigt während der Verfärbung des Paprika-Perikarps von grün nach rot die Akkumulation der Triacylglyceride an. Dies unterstützt die These, daß die Triacylglycerid-Akkumulation möglicherweise mit der Bildung von Plastoglobuli (Lipidtröpfchen) im

Zusammenhang steht, welche neben den Lipoprotein-Fibrillen (Deruère et al. 1994) als Absonderungsstrukturen für die Endprodukte der Carotinoidbiosynthese angesehen werden (Rabbani et al. 1994). Ferner sind die akkumulierten Tocopherole als Antioxidantien für den Peroxidationsschutz der Carotinoide und lipidgebundenen polyungesättigten Fettsäuren vorstellbar (Fryer 1992).

4.2 γ -Tocopherolmethyltransferase

4.2.1 Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Capsicum annuum*

Das von Camara et al. (1985) veröffentlichte Reinigungsprotokoll für die γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Capsicum annuum* umfaßte zwei Fällungsschritte (Aceton- und Ammoniumsulfatfällung), drei Chromatographie-Säulentrennungen (Affinitäts-Chromatographie, –Rechromatographie an Blue Sepharose und eine Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sepharose) und eine SDS-PAGE. Als γ -Tocopherolmethyltransferase wurde ein Protein von 33 kDa isoliert, welches in der Abwesenheit von Detergentien Aggregate mit hohen Molekulargewichten bildete (ohne Detergentien: 430 kDa, mit Detergentien: 165 kDa). Sequenzdaten wurden von der Arbeitsgruppe Camara aber nicht gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Publikation von Camara et al. (1985) die Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase bis zur vollständigen Homogenität nicht reproduziert werden. Aus diesem Grund wurden zusätzliche Säulenchromatographie-Schritte und veränderte Chromatographie-Bedingungen etabliert.

Vor der Beladung der ersten Säule wurden eine Acetonfällung und zwei fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen durchgeführt, wodurch sich die Gesamtproteinmenge um ca. 66 % verringerte. Die Reihenfolge der Säulenchromatographie-Trennungen wurde dahingehend verändert, daß die Anionenaustauscher-Chromatographie an den Anfang und die Affinitäts-Chromatographie an das Ende der Reinigung gesetzt wurden. Diese Maßnahme wurde bevorzugt, da das Enzym bei umgekehrter Reihenfolge der Säulenschritte nicht an die Affinitäts-säule gebunden hatte und, wie auch schon von Camara et al. (1985) beschrieben, so kein bedeutender Reinigungsfaktor erzielt werden konnte. Als zusätzliche Reinigungsschritte wurden eine zweite Anionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Sepharose (Rechromatographie) bei verändertem pH-Wert, eine Hydroxylapatit-Chromatographie und zwei Gelfiltrationen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Weiterhin wurden noch zwei weitere Säul-

len unter nativen und eine unter denaturierenden Bedingungen getestet. Dabei handelte es sich um eine Affinitäts-Chromatographie an Adenosin-Sepharose, eine Anionenaustauscher-Chromatographie an Res Q und um eine Adsorbtionschromatographie an YMC*Gel Butyl C₄ (denaturierende Bedingungen). Die beide nativen Säulentrennungen führten aber zu einem direkten Enzymaktivitätsverlust, der auf Wechselwirkungen des Proteins mit der Matrix zurückzuführen sein könnte. Die Adsorbtionschromatographie führte ebenfalls zu keiner Reinigung, da das Enzym irreversibel an die Säulenmatrix gebunden wurde. Eine Affinitätschromatographie mit SAM als Ligand war aufgrund der Instabilität dieses Substrates nicht möglich. Die Reinigung der γ -Tocopherolmethyltransferase stellte sich insgesamt aufgrund der hohen Aktivitätsverluste im Verlauf der Reinigung als schwierig dar. Um auf eine zeitraubende und durch Oberflächenabsorption verlustreiche Konzentrierung des Enzyms zwischen den Reinigungsschritten zu verzichten, mußte die gesamte Reinigung in verdünnten Enzymlösungen stattfinden. Die Enzymaktivität verringerte sich aber in verdünnten Lösungen deutlich. Daß Enzymlösungen zuweilen sehr labil sind, wenn bestimmte Stabilisatoren - wie z.B. andere Proteine des Rohextraktes - im Verlauf der Reinigung abgetrennt werden, ist bekannt. Versuche, das Enzym durch BSA, Glycerin etc. zu stabilisieren, schlugen fehl. PEG als einzig mögliche Konzentrierungsmethode konnte aufgrund der benötigten Zeit zur Reduktion der Lösung nur am Ende der Reinigungssequenz eingesetzt werden. Aus diesem Grunde wurden die beiden letzten Säulenschritte auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Durch die beschriebene Reinigungsprozedur konnte die γ -Tocopherolmethyltransferase bei einer Ausbeute von 9 % um den Faktor 45 (bezogen auf die konventionelle Reinigung) angereichert werden. Dieser Reinigungsfaktor ist mit dem der Arbeitsgruppe Camara und d'Harlingue (1985) und Ishiko et al. (1992) zu vergleichen.

4.2.2 Charakterisierung der γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Capsicum annuum* (rote Varietät)

Die Temperatur- und pH-Optima der γ -Tocopherolmethyltransferase lagen bei etwa 35°C und pH 7,5 und wurden im solubilisierten Enzymextrakt nach der Acetonfällung bestimmt. Diese Befunde stimmen grundsätzlich mit den für die γ -Tocopherolmethyltransferase erzielten Ergebnissen von Camara und d'Harlingue (1985) und Ishiko et al. (1992) überein.

Das Molekulargewicht der γ -Tocopherolmethyltransferase wurde mittels nativer Gelfiltration und der Photoaffinitätsmarkierung bestimmt. Durch Gelfiltration an einer Superdex

200-Säule wurde für das Rohenzym ein Molekulargewicht von mehr als 600 kDa kalkuliert, was darauf schließen läßt, daß im Rohenzym die γ -Tocopherolmethyltransferase als Aggregat aus mehr als 17 Monomeren vorlag. Je reiner das Enzym war, um so kleiner waren die Aggregate. Diese Aggregatbildung wurde auch schon von den Arbeitsgruppen Camara und d'Harlingue (1985) und Ishiko et al. (1992) beschrieben. Nach dem letzten Reinigungsschritt konnte mittels Gelfiltration für die γ -Tocopherolmethyltransferase das Molekulargewicht für ein Monomer von 36 kDa ermittelt werden.

Dieser Befund wurde durch die Photoaffinitäts-Markierung bekräftigt. Bei der Photoaffinitäts-Markierung handelt es sich um eine Methode, die bei der ACC-Synthase beschrieben wurde. Die ACC-Synthase (Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase) ist ein wichtiges Enzym der Ethylenbiosynthese und katalysiert mit Pyridoxalphosphat (PLP) als Cofaktor bei zwischenzeitlicher Bildung einer Schiff'schen-Base die Synthese von ACC (Satoh und Esashi 1986; Satoh und Yang 1989a und b, Yip et al. 1990). Während der Katalyse von ACC wird alle 30.000 Reaktionen durch eine β,γ -Spaltung, anstelle einer α,γ -Spaltung, ein Teil von SAM kovalent an einen Lysinrest im aktiven Zentrum gebunden. Die irreversible Hemmung der ACC-Synthase durch die kovalente Bindung des Substrates kann für eine Markierung des Enzyms mit ^{14}C -SAM genutzt werden (Satoh und Yang 1988; 1989a und b; Yip et al. 1990). Auch für verschiedene Methyltransferasen wurde die Markierung mit ^{14}C -SAM als Substrat bei einer Wellenlänge von 254 nm beschrieben (Som und Friedmann 1991; Subbaramaiah und Simms 1992).

Mit der für die ACC-Synthase und verschiedene andere Methyltransferasen beschriebenen Methode der Photoaffinitäts-Markierung konnte nach 2 Stunden Inkubation des partiell gereinigten Proteinextraktes ein Protein mit ^{14}C markiert werden. Nach der Inkubation wurden die Proteine mittels Chloroform/Methanol gefällt, anschließend in einem SDS-haltigen Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE nach ihren Molekulargewichten getrennt. Anhand der ^{14}C -Markierung einer Proteinbande im Gel konnte für die γ -Tocopherolmethyltransferase eine Molekülmasse von 36 kDa ermittelt werden. Da nur eine Bande markiert wurde, kann man eine unspezifische Markierung ausschließen. Außerdem hätten unspezifisch markierte Proteine auch nicht die SDS-Behandlung überstanden.

Die Ergebnisse von Gelfiltration und Photoaffinitäts-Markierung zeigen klar, daß es sich bei der γ -Tocopherolmethyltransferase um ein Monomer von 36 kDa handelt.

Im Folgenden wurde die Substratspezifität der γ -Tocopherolmethyltransferase untersucht. Als Substrate wurden β -, γ - und δ -Tocopherol und die entsprechenden Tocotrienole untersucht. SAM diente jeweils als zweites Substrat. Es wurde festgestellt, daß der partiell

gereinigten Proteinextrakt γ - und δ -Tocopherol und die entsprechenden Tocotrienole methyliert. β -Tocopherol und β -Tocotrienol wurden als Substrate nicht akzeptiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß nur der hydrophile Chromanolrest für die Substraterkennung wichtig ist, wobei die Methylierung speziell in der C5-Position (ortho-Position) stattfindet (siehe Abbildung 4-1), während der hydrophobe Schwanz lediglich zur Verankerung des Substrates eine Rolle spielt. Da es sich bei dem Enzymextrakt nicht um eine homogene Enzymlösung, sondern um einen partiell gereinigten Extrakt mit den entsprechenden Enzymaktivitäten handelte, wurden die Elutionsprofile der Methyltransferase-Aktivitäten für γ - und δ -Tocopherol näher untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß beide Enzymaktivitäten zu exakt denselben Zeiten von den verwendeten Säulen (Anionenaustauscher-Chromatographie und Chromatofocussing) eluierten. Außerdem wurde der Extrakt nach der partiellen Reinigung zusätzlich auf Methyltransferase-Aktivitäten untersucht und zeigte vergleichbare Aktivitäten für die Methylierung von γ -Tocotrienol und von γ -Tocopherol. Daraus kann man schließen, daß die genannten Substrate entweder durch ein Enzym oder durch Enzyme mit sehr ähnlichen Enzymeigenschaften bzw. sogar sehr ähnlichen Proteinsequenzen methyliert werden. Wie schon von Arango und Heise (1998) angenommen, handelt es sich bei der γ -Tocopherolmethyltransferase vermutlich um ein membrangebundenes Enzym.

Die Ergebnisse der kinetischen Eigenschaften der γ -Tocopherolmethyltransferase zeigen deutlich, daß es sich bei diesem Enzym um ein einfaches „Michaelis-Menten-Enzym“ handelt. Aus diesem Grunde wurden zur Bestimmung der K_m - und v_{max} -Werte für die vier Substrate die linearen Transformationen nach Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee durchgeführt. Da, wie aus Tabelle 3-6 ersichtlich, alle vier Vitamin E-Derivate ähnliche K_m -Werte aufwiesen, wurde der Quotient aus v_{max} und K_m gebildet. Der Quotient gibt Aufschluß über die Bevorzugung eines Substrates und wird normalerweise für die Charakterisierung von Isotopen-Effekten verwendet. Da in dem vorliegenden Fall ein ähnlicher Effekt, nämlich ein sogenannter Substitutionseffekt betrachtet wird, ist die Wahl dieser Auswertungsmethode zulässig (Biswanger 1994). Anhand der Quotienten kann man schließen, daß keines der Vitamin E-Derivate direkt bevorzugt wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die gelbe Varietät von *Capsicum annuum* erhalten, mit der Einschränkung, daß die Maximalgeschwindigkeit verglichen mit der roten Varietät um den Faktor 2 kleiner war.

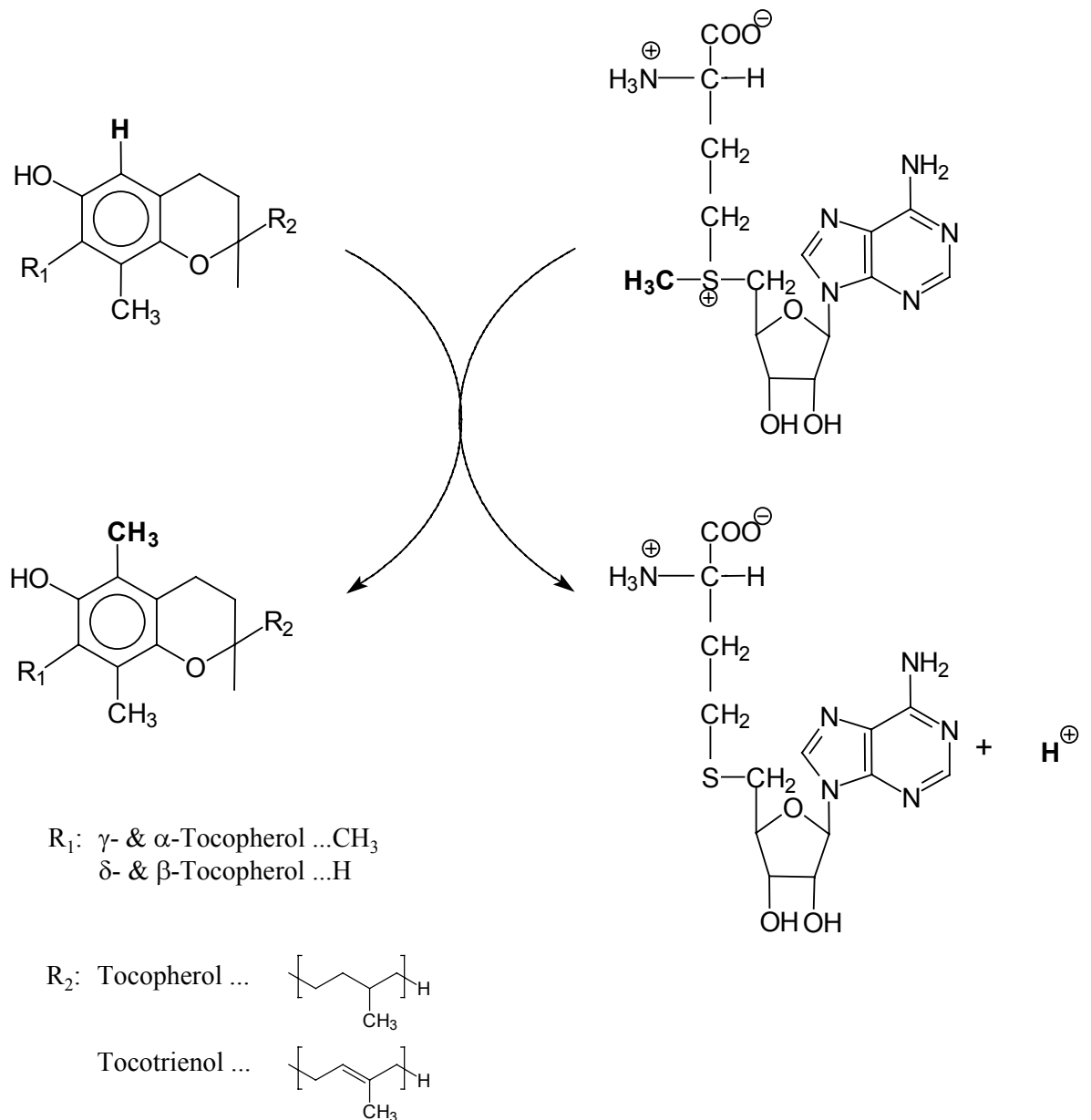


Abbildung 4-1: Methylierung von γ - bzw. δ -Tocopherol / Tocotrienol (1) durch S-Adenosylmethionin (3). Die Reaktionsprodukte sind α - bzw. β -Tocopherol / Tocotrienol (2) und S-Adenosylhomocystein (4).

4.2.3 Charakterisierung der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*

Die mittels der Affinitätschromatographie an Nickel-Agarose gereinigte rekombinante γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* hatte bei etwa 33°C und einem pH-Wert von 8,5 ihre maximale Aktivität. Die Enzymaktivität war in einem pH-Bereich von 8,0 bis 9,5 und bei einer Salzkonzentration von 10 bis 250 mM relativ stabil. Zweiwertige

Ionen (wie Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+}) erhöhten die Enzymaktivität nicht, sondern konnten bei höheren Konzentrationen hemmend wirken (siehe Abbildung 3-26). Der Zusatz von EDTA hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. Dithiothreitol (5 mM) stimulierte die Enzymaktivität um 30-35 %. Die Zugabe von Detergenzien wie 0,5 % CHAPS erhöhten die Aktivität ebenfalls um ca. 30 %. Zur Lagerung der γ -Tocopherolmethyltransferase wurde ein 50 mM Trispuffer, welcher 10% Glycerin enthielt, benutzt. Bei $-80^{\circ}C$ konnte das Enzym ohne wesentlichen Aktivitätsverlust gelagert werden.

Das Molekulargewicht der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase wurde mittels denaturierender SDS-PAGE auf 36 kDa geschätzt.

Die Methylierungsexperimente der sechs Vitamin E-Derivate, β -, γ - und δ -Tocopherol sowie der entsprechenden Tocotrienole mit SAM als Methylendonor zeigten, daß das rekombinante Enzym nur γ - und δ -Tocopherol für die Methylierungsreaktion akzeptierte. β -Tocopherol und die Tocotrienolverbindungen wurden nicht als Substrate akzeptiert. Diese Beobachtung zeigt deutlich, daß auch die rekombinante γ -Tocopherolmethyltransferase den Chromanolrest des Akzeptormoleküls spezifisch in C5-Position (ortho-Position) methylierte (siehe Abbildung 4-2).

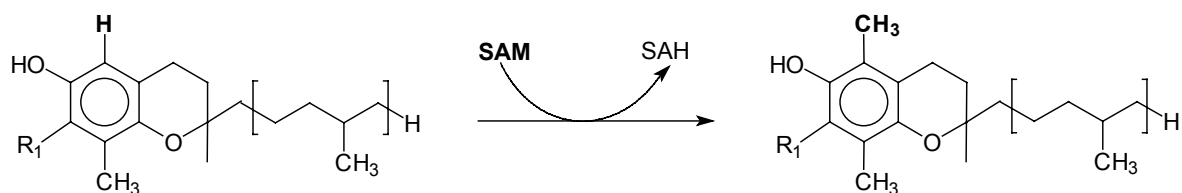


Abbildung 4-2: Orthospezifische Methylierung der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase. Bei der Reaktion von γ - zu α -Tocopherol steht R_1 für CH_3 , bei der Reaktion von δ - zu β -Tocopherol R_1 für H .

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die rekombinante γ -TMT γ - oder δ -Tocopherol als Methylierungsakzeptor bevorzugt. Zur Klärung wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit des rekombinanten Enzyms in Abhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Substrate dem typischen hyperbolischen Verlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik folgte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die K_m -Werte für alle drei Substrate sehr ähnlich waren und zwar für γ -Tocopherol: $4,9 \mu M$, für δ -Tocopherol $3,8 \mu M$ und für S-Adenosyl-Methionin $4,9 \mu M$. Die

Maximalgeschwindigkeiten für γ -Tocopherol und S-Adenolsyl-Methionin waren mit etwa 15 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein identisch. Die Maximalgeschwindigkeit für δ -Tocopherol war aber rund zweimal größer, was auch in dem Verhältnis der $v_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ -Werte von δ - zu γ -Tocopherol zum Ausdruck kommt. Damit wurde gezeigt, daß δ -Tocopherol als Substrat der rekombinanten γ -TMT aus *Arabidopsis* bevorzugt wird.

Die erhaltenen Daten stimmen zwar bezüglich der Positionsspezifität des Enzyms bei der Methylierung des Tocopherol-Substrates, nicht aber in Bezug auf das bevorzugte Methylierungssubstrat mit denen der Arbeitsgruppe DellaPenna et al.(1998) überein. Diese Autoren fanden eine zweifach höhere spezifische Aktivität für γ -Tocopherol als Substrat. Da diese Feststellungen jedoch nicht auf kinetischen Untersuchungen, sondern allein auf Endpunkt-messungen bei sehr unterschiedlichen γ - (50 μM) und δ -Tocopherol-Konzentrationen (5 mM) basieren, kann jedoch eine Substratüberschuß-Hemmung nicht ausgeschlossen werden, was die niedrigere Maximalgeschwindigkeit dieser Autoren für δ -Tocopherol erklären würde. Außerdem wäre noch zu klären, ob der His-tag und das Transitpeptid, bei dem von der Firma SunGene gewählten Expressionssystem, einen Einfluß auf die Substratspezifität hat.

Da die γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Arabidopsis* δ -Tocopherol als Substrat bevorzugt, in Wildtyp *Arabidopsis* Pflanze aber hauptsächlich α -Tocopherol und nicht β -Tocopherol gebildet wird, kann man aus den Daten schlußfolgern, daß die Regulation dieses Stoffwechselweges auf einer früheren Ebene der Tocopherolbiosynthese (siehe Abbildung 1-4) stattfinden muß.

4.2.4 Reaktionsmechanismus der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*

Bei der durch die rekombinante γ -Tocopherolmethyltransferase katalysierten Enzymreaktion handelt es sich um eine Zwei-Substrat-Reaktion. Die Substratbindung eines Enzyms kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Man unterscheidet generell zwei Arten, den sequentiellen und den Ping-Pong-Mechanismus. Der sequentielle Mechanismus wird in zwei Untergruppen unterteilt, den Random-Mechanismus und den Ordered Bi Bi-Mechanismus mit seinen zwei Spezialfällen, dem Theorell-Chance- und dem Iso-Ordered Bi Bi-Mechanismus. Durch kinetische Untersuchungen mit variierenden Substratkonzentrationen kann man zwar zwischen einem sequentiellen und einem Ping-Pong-Mechanismus unterscheiden, den genauen Typ des sequentiellen Mechanismus kann man aber erst nach Produktinhibierungsexperimenten bestimmen (Hübner 1989).

Aus den Untersuchungen mit variierenden Substratkonzentrationen (siehe Abbildung 3-33) kann man entnehmen, daß die durch die rekombinante γ -Tocopherolmethyltransferase katalysierte Enzymreaktion dem sequentiellen Mechanismus folgt. Durch Produktinhibierungsexperimente (Abbildung 3-34) konnte der Typ genauer bestimmt werden. Alle 4 Möglichkeiten der Substrat-Produkt-Variation ergaben eine Nicht Kompetitive Inhibierung. Die Auswertung erfolgte nach Lineweaver Burk und Hanes. Anhand der vorliegenden Daten wird für die Zwei-Substrat-Reaktion der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase ein Iso-Ordered Bi Bi-Mechanismus vorgeschlagen. Bei dem Iso-Ordered Bi Bi-Mechanismus handelt es sich wie oben beschrieben um einen Spezialfall des Ordered Bi Bi-Mechanismus, bei dem es zu einer Isomerisierung des Enzyms im zentralen Komplex kommt (Abbildung 4-3).

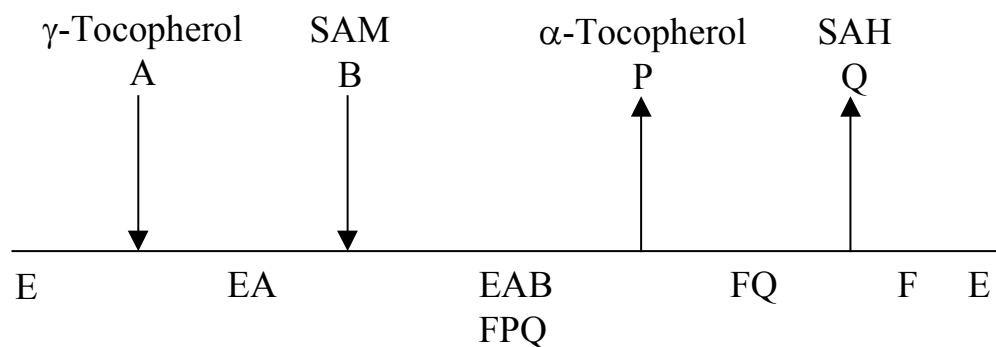


Abbildung 4-3: Schema für den Iso-Ordered Bi Bi-Mechanismus einer Zwei-Substrat-Reaktion

4.2.5 γ -Tocopherolmethyltransferase-Antisense-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*

Um zu klären, ob es sich bei der γ -Tocopherolmethyltransferase um ein Schlüsselenzym der Vitamin E-Biosynthese handelt oder ob die Endprodukte des Enzyms als Regulator der Tocopherolbiosynthese fungieren, wurden γ -Tocopherolmethyltransferase-Antisense-Pflanzen von *Arabidopsis* auf ihren Tocopherolgehalt und die Tocopherolverteilung hin untersucht. Die Pflanzen wurden von der Firma SunGene (Dr. Ebneith) zur Verfügung gestellt.

Es wurden zwei Pflanzenlinien (Linie 218-b und SG 19) untersucht und sieben Pflanzen der 218-b Linie mit geringem α -Tocopherolgehalt selektiert. Diese Pflanzen (2, 4, 5, 10, 12, 14 und 25) hatten einen erhöhten γ -Tocopherolspiegel und nur wenig α -Tocopherol. Der Gesamttocopherolgehalt veränderte sich in Bezug auf den Wildtyp dagegen nicht. Von den Pflanzen wurden Samen gewonnen. Bei der Nachkommenschaft der F2-Generation der Pflan-

ze 5 konnte kein α -Tocopherol mehr nachgewiesen werden, d.h. die Pflanze fünf war in Bezug auf den γ -Tocopherolmethyltransferase-Antisense-Phänotyp stabil. Der Gesamttocopherolgehalt veränderte sich dagegen im Vergleich zum Wildtyp nicht. Da sich also nur die Tocopherolverteilung aber nicht der Gesamttocopherolgehalt änderte, wird angenommen, daß das Endprodukt der γ -Tocopherolmethyltransferase α -Tocopherol keine Feedback Reaktion auf die Vitamin E-Biosynthese ausübt.

Diese Befunde bestätigen die durch die Arbeitsgruppe DellaPenna 1998 publizierten Ergebnisse. Diese Autoren transformierten *Arabidopsis* mit dem Pflanzenexpressionskonstrukt pDC3 A.t. γ -TMT, welches die volllängen-cDNA der *Arabidopsis* γ -Tocopherolmethyltransferase unter der Kontrolle des samenspezifischen DC3-Promoter aus Karotten enthält. Aus ihren Untersuchungen schlossen sie, daß die γ -Tocopherolmethyltransferase nur das Verhältnis von α - zu γ -Tocopherol, aber nicht den Gesamttocopherolgehalt in den Samen beeinflußt.

Aus allen hier dargestellten Ergebnissen kann man folgern, daß die Regulation auf einer früheren Stufe der Tocopherolbiosynthese stattfinden muß. So scheint es wahrscheinlich, daß die α -Tocopherolbiosynthese während der Entwicklung vom Etio- zum Chloroplasten bzw. vom Chloro- zum Chromoplasten (Lichtenthaler 1966) und während der Seneszenz bzw. Verwundung (Rise et al. 1989) auf der Stufe der mRNA-Expression von Genen reguliert wird, die für die Biosynthese von Tocopherolvorstufen wie 4-Hydroxyphenylpyruvat, Homogentisinsäure, Isopentenylpyrophosphat und Phytylpyrophosphat codieren. Die Akkumulation dieser Vorstufen wird durch erhöhte Aktivitäten der Tyrosinaminotransferase (TAT), der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (OHPP-Dioxygenase), einer Transketolase (CapTKT2) und der Geranylgeranyl-Reduktase induziert, deren cDNAs inzwischen cloniert und überexprimiert wurden (Lopukhina et al. 2001, Norris et al. 1998, Bouvier et al. 1998, Keller et al. 1998). Interessanterweise können Seneszenz-auslösende Phytohormone wie Ethylen und Octadecanoide wie z.B. Jasmonat zu einer Steigerung der genannten Enzyme (Kleber-Janke und Krupinska 1997, Lopukhina et al. 2001) und damit möglicherweise zur Synthese von Vitamin E führen, das wie bereits beschrieben eine Schutzfunktion gegen die bei Pathogenangriff, Streß und Chlorophyllabbau gebildeten reaktiven Sauerstoff-Spezies bildet.

4.3 Weiterführende Experimente

1. Nach der Erstellung einer c-DNA-Bank aus Früchten von *Capsicum annuum* wäre es möglich, anhand der Sequenzdaten der γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* Oligonukleotidprimer spezifisch für Methyltransferase-Motive abzuleiten, mit denen diese cDNA-Bank mit PCR-Methoden durchsucht werden könnte. Aus der erhaltenen cDNA kann die Proteinsequenz der γ -TMT aus *Capsicum* ermittelt werden. Anschließend könnte das Enzym aus *Capsicum* mittels molekularbiologischer Methoden in *E. coli* exprimiert werden. Das im heterologen System produzierte Enzym kann dann mit dem aus *Arabidopsis* in Bezug auf Substratspezifität verglichen werden. Außerdem wäre es möglich, anhand des in *E. coli* produzierten Enzyms zu klären, ob es sich bei der beschriebenen Methyltransferase-Aktivität (Umsatz von Tocopherol und Tocotrienol) in *Capsicum* um die Enzymaktivität von einem oder mehreren Enzymen handelt. Außerdem könnte auf diese Weise untersucht werden, ob Isoenzymformen in *Capsicum* existieren.
2. In bestimmten Entwicklungsphasen führt ein Überschuß an Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat zur Erhöhung der Biosynthese der Carotinoide. Diese Carotinoide werden dann im Chromoplasten abgelagert. Deshalb wäre es von Interesse zu untersuchen, ob die Tocotrienolbiosynthese, in der ebenfalls Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat als Synthesevorstufe verwendet wird, im Zusammenhang mit der Ausbildung der Chromoplasten zu sehen ist.
3. Die Fragestellung, ob der His-tag und das Transitpeptid die Substratspezifität der γ -TMT beeinflussen, könnte durch die Wahl eines Expressionsvektors, welcher keinen His-tag nach der Expression ausbildet, und der Modifizierung der cDNA durch PCR, so daß kein Transitpeptid mehr vorhanden ist, untersucht werden.
4. Unabhängig von den oben dargestellten Problemstellungen wäre es interessant, mehr über die Regulation der Tocopherolbiosynthese zu erfahren. Hierzu könnten Mutationen erzeugt werden, welche einen Defekt in der Tocopherolbiosynthese aufweisen.

5 Zusammenfassung

1. Photosynthetisch aktive Algen und Pflanzenorgane enthalten vergleichbare Mengen an α -Tocopherol. In den untersuchten Pflanzensamen fällt die starke Anhäufung von γ -Tocopherol auf.
2. Blütenblätter von Tagetes und Fruchtschalen von *Capsicum annuum* (Paprikaschoten) akkumulieren α -Tocopherol in relativ hohen Konzentrationen.
3. In den Plastiden reifer Paprikaschoten steigt mit der Zunahme der Carotinoidkonzentration der Gehalt an Tocopherolen und Triacylglyceriden mit steigenden Anteilen an ungesättigten Fettsäuren an. Diese spezifische Lipidakkumulation wird mit der Carotinoidablagerung in Liposomen (Plastoglobuli) in Zusammenhang gebracht. Die Tocopherolzusammensetzung ist durch hohe α -Tocopherol- und geringe β - und γ -Tocopherolgehalte gekennzeichnet.
4. Die γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Capsicum* (rote Früchte) wurde mit einem Reinigungsfaktor von 45 partiell gereinigt. Eine Reinigung bis zur vollständigen Homogenität war nicht möglich, da das Enzym sehr instabil war. Die Lebensdauer in verdünnter Lösung betrug fünf Tage. Die Konzentrierung des Proteins war wegen des lipophilen Charakters des Enzyms mit herkömmlichen Methoden nicht möglich. Mit BSA und Lipiden war es nicht möglich, die γ -Tocopherolmethyltransferase zu stabilisieren.
5. Charakterisierung der γ -Tocopherolmethyltransferase aus roten Paprikaschoten:
 - Das Enzym zeigte ein pH-Optimum von pH 7,5.
 - Das Temperatur-Maximum lag bei 35°C.
 - Die Molekülmasse des Enzyms wurde mittels Gelfiltration und Photoaffinitätsmarkierung auf 36 kDa geschätzt.
 - Das partiell gereinigte Enzym zeigte Methyltransferaseaktivität sowohl für γ - und δ -Tocopherol wie auch für die entsprechenden Tocotrienole. β -Tocopherol bzw. β -Tocotrienol wurden als Substrat nicht akzeptiert.

Daraus wurde gefolgert, daß die γ -Tocopherolmethyltransferase die aromatische Kopfgruppe vom Tocopherol spezifisch an der C5-Position in ortho-Stellung zur Prenylgruppe methyliert.

Ein bevorzugtes Substrat wurde nicht gefunden.

6. Charakterisierung der γ -Tocopherolmethyltransferase aus gelben Paprikaschoten:
 - Das Enzym aus gelben Paprikaschoten zeigte die gleichen Substratspezifitäten wie das aus roten Paprikaschoten. Die maximale Aktivität war jedoch nur halb so groß.

7. Charakterisierung der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*, die in *E. coli* überexprimiert wurde:
 - Das mittels Affinitätschromatographie gereinigte Enzym zeigte ein Temperaturmaximum von $\approx 33^\circ\text{C}$ und ein pH-Optimum von 8,5. Die Enzymaktivität war in einem pH-Bereich von pH 8,0 bis pH 9,5 und bei einer Salzkonzentration von 10 bis 250 mM stabil.
 - Die Zugabe von DTT und CHAPS erhöhte die Enzymaktivität.
 - Die Molekülmasse wurde mittels SDS-PAGE auf 36 kDa geschätzt.
 - Das Enzym methylierte γ - bzw. δ -Tocopherol spezifisch in C5-Position (ortho-Stellung) und bildete so α - bzw. β -Tocopherol. β -Tocopherol sowie β -, γ - und δ -Tocotrienol wurden nicht als Substrat akzeptiert.
 - Mittels kinetischer Untersuchungen wurde festgestellt, daß die rekombinante γ -Tocopherolmethyltransferase δ -Tocopherol als Substrat bevorzugte.

8. Reaktionsmechanismus der rekombinanten γ -Tocopherolmethyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*:
 - Kinetische Messungen ergaben, daß die von dem untersuchten Enzym katalysierte Zweisubstrat-Reaktion einem sequentiellen Mechanismus folgte.
 - Der Typ der sequentiellen Reaktion konnte durch Produkthemmungsuntersuchungen bestimmt werden. Alle vier möglichen Inhibierungsvarianten zeigten eine Nicht-Kompetitive Hemmung. Nach Bisswanger (1994) kann man aus dem Muster der Produkthemmung auf einen Iso-ordered Bi Bi-Mechanismus schließen. Bei dem genannten Mechanismus handelt es sich

um einen Spezialfall des Ordered Bi Bi-Mechanismus, bei dem das Enzym im zentralen Komplex isomerisiert vorliegt.

6 Abkürzungsverzeichnis

AdoMet	siehe SAM
AdoHcy	siehe SAH
ACC	Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
APS	Ammoniumperoxysulfat
BHA	2,3- <i>tert</i> -Butylhydroxyanisol
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy-Desoxyribonucleinsäure
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl-dimethyl-ammonio]- propansulfonat
DEA	Diethaloamin
DEAE	Diethylaminoethyl
DTT	Dithiotereitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Protein, peptid and polynucleotide Liquid Chro- matography
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
His	Aminosäure: Histidin
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High-Performance Thin Layer Chromatographie
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
kat	Einheit für die Enzymaktivität: 1 Katal entspricht 1mol Substratumsatz pro Sekunde
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstrate
LB	Luria Broth; ein Bakterienmedium
LMW	Low Marker Weight
M	Konzentrationsangabe: Molar (mol/l)
Mes	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
NAD / NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinukleotid, oxydiert/reduziert

NADP / NADPH	β -Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, oxidiert/reduziert
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n. d.	nicht detektiert (unter den gewählten Meßbedingungen nicht nachweisbar)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDA	Photo-Diodenarray
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
-PP	-pyrophosphat
PUFA	poly unsaturated fatty acid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RP	Reverse Phase
SAH	S-adenosyl-L-homocysteine (engl. AdoHcy)
SAM	S-adenosyl-L-methionine, (engl. AdoMet)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	tris-buffered-saline
TBST	TBS + Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin;
TG	Trockengewicht
TOC	Tocopherol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tricine	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
UV	ultraviolettes Licht
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
% v/v	Volumenprozent ml/100ml
% w/v	Prozent mg/100ml
% w/w	Gewichtszent mg/100mg
γ -TMT	gamma-Tocopherolmethyltransferase
\approx	rund

7 Literaturverzeichnis

Aach, H. und Heise, K.-P. (1998) On the Compartmentation of Triacylglycerol Synthesis in Developing Seeds of *Brassica napus*.

Bot. Acta 111, 123-129

Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P. R., Rautalahti, M., Pietinen, P. und Heinonen, O. P. (1997) Effects of supplemental beta-carotene, cigarette smoking and alcohol consumption on serum carotenoids in the alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study.

American Journal of Clinical Nutrition 66, 366-372

Arango, Y. und Heise, K.-P. (1997) α -Tocopherol synthesis by *Capsicum* fruit chromoplasts.

J. Plant Physiol. 150, 509-513

Arango, Y. und Heise, K.-P. (1998) Tocopherol synthesis from homogentisate in *Capsicum annuum* L. (yellow pepper) chromoplast membranes: evidence for tocopherol cyclase.

Biochem. J. 336, 531-533

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolpyruvate in *Beta vulgaris*.

Plant Physiol 24, 1-15

Asada, K. und Takahashi, M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis.

In: Photoinhibition, Eds. D. J. Kyle, C. B. Osmond and C. J. Arntzen, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 227-280

Balz, M., Schulte, E. und Thier, H.-P. (1992) Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen durch HPLC.

Fat Science Technology 94, 209-213

Bauernfeind, J. (1980) A comprehensive treatise.

In: Vitamin E, Ed. L.J. Machlin, Vol. 1, Marcel Bekker Inc, New York

Bisby, R. H., Ahmed, S. und Cundall, R. B. (1984) Repair of amino acid radicals by a Vitamin E analogue.

Biochemical and Biophysical Research Communications 119, 245-251

Bisswanger, H. (1994) Mehrsubstrat-Reaktionen.

In: Enzymkinetik, Ed. H. Bisswanger, VCH-Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 131-145

Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R. A. und Camara, B. (1998) Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits.

Plant Physiol. 117, 1423-1431

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding.

Anal. Biochem. 72, 248-254

Brubacher, G. und Weiser, H. (1967) Biologische Wirksamkeit von Tocopherol und von Antioxydantien.

In: Tocopherole, Wiss. Veröff. dtsh. Ges. Ernährung, Ed. K. Lang, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 50-66

Bucke, C., Leech, R. M., Hallaway, M. und Morton, R. A. (1966) The taxonomic distribution in leaves of *Vicia faba* L..

Biophys. Acta 112, 19-34

Buck, M. und Chojkier, M. (1996) Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants.

EMBO Journal 15, 1753-1765

- Burton, G. W. und Ingold, K. U.** (1981) Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*.
J. Am. Chem. Soc. 103, 6472-6477
- Burton, G. W., Joyce, A. und Ingold, K. U.** (1983) Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?
Arch. Biochem. Biophys. 221, 281-290
- Camara, B. und Moneger, R.** (1977) Les lipides du fruit vert et du fruit mur de poivron (*Capsicum annuum* L.).
Physiologie Végétale 15, 711-22
- Camara, B., Bardat, F., Seye, A., d'Harlingue, A. und Moneger, R.** (1982) Terpenoid metabolism in plastids. Localization of α -Tocopherol synthesis in *Capsicum* chromoplasts.
Plant Physiol. 70, 1562-1563
- Camara, B., Bardat, F., Dogbo, O. Brandeon, J. und Moneger, R.** (1983) Terpenoid metabolism in plastids. Isolation and biochemical characteristics of *Capsicum annuum* chromoplasts.
Plant Physiol. 73, 94-99
- Camara, B.** (1985a) Carotene synthesis in *Capsicum* chromoplasts.
Methods in Enzymology 110, 244-253
- Camara, B.** (1985b) S-Adenosylmethionine: γ -Tocopherol Methyltransferase (*Capsicum* Chromoplasts).
Methods in Enzymology 111, 544-547
- Camara, B. und d'Harlingue, A.** (1985) Demonstration and Solubilisation of S-adenosylmethionine: γ -tocopherol Methyltransferase from *Capsicum* Chromoplasts.
Plant Cell Reports 4, 31-32

Cleland W. W. (1963) The Kinetics of Enzyme-catalyzed Reaction with Two or More Substrates or Products.

Biochim. Biophys. Acta 67, 104-137

Comstock, G. W., Alberg, A. J., Huang, H. Y., Wu, K., Buke, A. E., Hoffman, S. C., Norkus, E. P., Gross, M., Cutler, R. G. I., Morris, J. S., Spate, V. L. und Helzlouser, K. J. (1997) The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: Ascorbic acid, Carotenoids, alpha-Tocopherol, Selenium and peroxy radical absorbing capacity.

Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 11, 907-916

Dasilva, E. J. und Jensen, A. (1971) Content of α -tocopherol in some blue-green algae.

Biochim. Biophys. Acta 239, 345-347

Deruère, J., Römer, S., d'Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kuntz, M. und Camara, B. (1994) Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supra-molecular lipoprotein structures.

The Plant Cell 6, 119-33

d'Harlingue, A. und Camara, B. (1985) Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis. purification and characterization of γ -tocopherol methyltransferase from *Capsicum* Chromoplasts.

J. Biol. Chem. 260, 15200-15203

Evans, H. M., Emerson, O. H. und Emerson, G. A. (1936) The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -Tocopherol, having the properties of Vitamin E.

J. Biol. Chem. 113, 319-332

Fernholz, E. (1938) Constitution of α -Tocopherol.

J. Am. Chem. Soc. 60, 700-705

Fukuzawa, K., Chida, H., Tokumura, A. und Tsukatani, H. (1981) Antioxidative effect of α -Tocopherol incorporated into lectithin liposomes on ascorbic acid-iron(2+)-induced lipid peroxidation.

Arch. Biochem. and Biophys. 206, 173-180

Fukuzawa, K., Tokumura, A., Ouchi, S. und Tsukatani, H. (1982) Antioxidant activities of Tocopherols on iron(2+)-ascorbate-induced lipid peroxidation in lectithin liposomes.

Lipids 17, 511-513

Fukuzawa, K. und Gebicki, J. M. (1983) Oxidation of α -Tocopherol in micells and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl and superoxide free radicals.

Arch. Biochem. and Biophys. 226, 242-251

Fryer, M. J. (1992) The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -Tocopherol).

Plant Cell and Env. 15, 381-392

Henry, A., Powls, R. und Pennock, J. F. (1987) Intermediates of Tocopherol biosynthesis in the unicellular alga *Scenedesmus obliquus*. The presence of three isomeric methylphytylbenzoquinones.

Biochem. J. 242, 367-373

Hess, J. L. (1993) Vitamin E, α -tocopherol.

In: Antioxidants in Higher Plants. Ed. R. Alscher and J. Hess, Boca Raton: CRC, 111-134

Hirai, T., Majima, Y., Ohta, Y. und Ishiguro, I. (1985) Antioxidative role of Vitamine E in rabbit lens.

Atarashii Ganka 2, 1174-1177

Hirai, S., Tanaka, M. und Somomatsu, A. (1990) Free radicals and degenerative diseases of the nervous system.

Japanese Journal of Geriatrics 27, 171-176

Hübner, G. (1989) Enzymkinetik.

In: Enzymkatalyse, Ed. A. Schellenberger, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 71-131.

Jungblut, P. R. und Seifert, R. (1990) Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alteration in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells.

J. Biochem. Biophys. Methods 21, 47-58

Kagan, V. E., Kuliev, I. Y., Spirichev, V. B., Shvedova, A. A. und Kozlov, Y. P. (1981) Accumulation of lipid peroxidation products and inhibition of electric activity of the retina in Vitamin E deficient rats exposed to high intensity light.

Byulleten Eksperimental noi Biologii i Meditsiny 91, 165-167

Kellner, Y., Bouvier, F., d'Harlingue, A. und Camara, B. (1998) Metabolic compartmentation of plastid prenyl lipid biosynthesis evidence for the involvement of multifunctional geranylgeranyl reductase.

European Journal of Biochemistry 251, 413-417

Kleber-Janke, T. und Krupinska, K. (1997) Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions.

Planta 203, 332-340

Larson, R. A. (1988) The antioxidants of higher plants.

Phytochemistry 27, (4), 969-978

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227, 680-685

Lichtenthaler, H. K. (1968) Verbreitung und relative Konzentration der lipophilen Plastidenchinone in grünen Pflanzen.

Planta 81, 140-152

Leung, H., Vang, M. J. und Mavis, R. D. (1981) The co-operative interaction between Vitamin E and Vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids.

Biochim. Biophys. Acta 664, 266-272

Liebler, D. C., Kling, D. S. und Reed, D. J. (1986) Antioxidant protection of phospholipid bilayers by α -Tocopherol. Control of α -Tocopherol status and lipid peroxidation by Ascorbic acid and Glutathione.

J. Biol. Chem. 261, 12114-12119

Logani, M. K. und Davies, R. E. (1980) Lipid oxidation: biological effects and antioxidants. Lipids 15, 485-495

Lopukhina, A., Dettenberg, M., Weiler, E. W. und Holländer-Czytko, H. (2001) Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*.

Plant Physiol. 126, 1678-1687

Marshall, P. S., Morris, S. R. und Threlfall, D. R. (1985) Biosynthesis of tocopherols a re-examination of the biosynthesis and metabolism of 2-methyl-6-phytyl-1,4-bezoquinol.

Phytochemistry 24, 1705-1711

Matsuo, M. und Matsumoto, S. (1983) Electron spin resonance spectra of the chromanoxyl radicals derived from tocopherols (Vitamin E) and their related compounds.

Lipids 18, 81-86

McLaughlin, P. J. und Weihrauch, J. L. (1979) Vitamin E content of foods.

J. Am. Diet Assoc. 75, 647-665

Miguezburbanco, M. J., Shorposner, G., Flechter, M. A., Lu, Y., Moreno, J. N., Carcamo, C., Page, B., Quesada, J., Sauberlich, H. und Baum, M. K. (1995) Immunoglobulin E levels in relationship to HIV-1 disease, route of infection and vitamin E status.

Allergy 50, 157-161

Nakao, N., Frodl, E. M., Duan, W.-M., Widner, H. und Brundin, P. (1994) Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12408-12412

- Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R. und Kamiya, Y.** (1982) Regeneration of Vitamin E from α -chomanoxyl radical by glutathione and Vitamin C.
Chemical Letters 6, 789-792
- Niki, E., Saito, T., Kawakami, A. und Kamiya, Y.** (1984) Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by Vitamin E and Vitamin C.
J. Biol. Chem. 259, 4177-4182
- Niki, E., Tsuchiya, J., Yoshikawa, Y., Yamamoto, Y. und Kamiya, Y.** (1986) Oxidation of lipids. XIII. Antioxidant activities of α -, β -, γ - and δ -Tocopherols.
Bulletin of the Chemical Society of Japan 59, 497-501
- Nishikimi, M., Yamada, H. und Yagi, K.** (1980) Oxidation by superoxide of Tocopherols dispersed in aqueous media with deoxycholate.
Biochim. Biophys. Acta 627, 101-108
- Norris, S. R., Barrette, T. R., DellaPenna D.** (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation.
Plant Cell 7, (12), 2139-2149
- Packer, J. E., Slater, T. F. und Wilson, R. L.** (1979) Direct observation of a free radical interaction between Vitamin E and Vitamin C.
Nature 278, 737-738
- Pennock, J. F., Hemming, F. W. und Kerr J. D.** (1964) A reassessment of Tocopherol in chemistry.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 17, 542-545
- Periquet, B. A., Jammes, N. M., Lambert, W. E., Tricoire, J., Moussa, M. M., Garcia, J., Ghisolfi, J. und Thouvenot, J.-P.** (1995) Micronutrient levels in HIV-1-infected children.
AIDS 9, 887-893

- Powls, R. und Redfearn, E. R.** (1967) The Tocopherols of the Blue-Green Algae.
Biochem. J. 104, 24c-26c
- Rabbani, S., Beyer, P., v. Lintig, J., Hugueney, P. und Kleinig, H.** (1998) Induced β -carotene synthesis driven by triacolglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardwadii*.
Plant Physiol. 116, 1239-1248
- Rise, M., Cojocarn, M., Gottlieb, H. E. and Goldschmidt, E. E.** (1989) Accumulation of α -Tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation.
Plant Physiol. 89, 1028-1030
- Sano, M., Ernesto, C., Klauber, M. R., Shafer, K., Woodbury, P., Thomas, R., Grundman, M., Crowdon, J. und Thal, J.** (1996) Rationale and design of a multicenter study of selegiline and alpha-tocopherol in the treatment of Alzheimer disease using novel clinical outcomes.
Alzheimer Disease & Associated Disorders 10, 132-140
- Satoh, S. und Esashi, Y** (1986) Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase of etiolated mung bean hypocotyl segments by its substrate, S-adenosylmethionine.
Plant Cell Physiol. 27, 285-291
- Satoh, S. und Yang, S. F.** (1988) S-Adenosylmethionine-dependent interaction and radiolabeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits.
Plant Physiol. 88, 109-112
- Satoh, S. und Yang, S. F.** (1989a) Specificity of S-adenosyl-L-methionine in the inactivation and the labeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid synthase.
Arch. Biochem. Biophys. 271, 107-112
- Satoh, S. und Yang, S. F.** (1989b) Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by L-vinylglycine as related to the mechanism-based inactivation of the enzyme by S-adenosyl-L-methionine.
Plant Physiol. 91, 1036-1039

Sauer, A. und Heise, K.-P. (1983) On the light dependence of fatty acid synthesis in spinach chloroplasts.

Plant Physiol. 73, 11-15

Scarpa, M., Rigo, A., Maiorino, M., Ursini, F. und Gregolin, C. (1984) Formation of α -Tocopherol radical and recycling of α -Tocopherol by Ascorbate during peroxidation of phosphatidyl choline liposomes: an electron paramagnetic resonance study.

Biochim. Biophys. Acta 801, 215-219

Schultz, G., Soll, J., Fiedler, E. und Schulze-Siebert, D. (1985) Synthesis of prenylquinones in chloroplasts.

Physiol. Plant 64, 123-129

Shintani, D. und DellaPenna, D. (1998) Elevating the Vitamin E content of plants through metabolic engineering.

Science 282, 2098-2100

Skinner, W. A. und Sturm, P. A. (1968) Investigation of algae and yeast for α -Tocopherol and α -Tocopherolquinone content.

Phytochemistry 7, 1893-1896

Soll, J. (1985) α -Tocopherol and plastoquinone synthesis in chloroplast membranes.

Methods in Enzymology 148, 383-393

Soll, J. und Schultz, G. (1980) 2-methyl-6-phytylquinol and 2,3-dimethyl-5-phytylquinol as precursors of tocopherol synthesis in spinach Chloroplasts.

Phytochemistry 19, 215-218

Soll, J., Schulz, G., Joyard, J., Douce, R. und Block, M. A. (1985) Localisation and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts.

Arch. Biochem. Biophys. 238, 290-299

Som, S. und Friedmann, S. (1991) Identification of a highly conserved domain in the EcoRII methyltransferase which can be photolabeled with S-Adenosyl-L-[methyl-³H]methionine.

J. Biol. Chem. 266, 2937-2945

Stocker, A. (1992) Identifikation und Isolierung der Tocopherol-Cyclase aus *Anabaena variabilis* Kützing (Cyanobacteria).

Dissertation Universität Zürich

Stocker, A., Netscher, T., Rüttimann, A., Müller, R. K., Schneider, H., Todaro, L. J., Derungs, G. und Woggon, W.-D. (1994) The reaction mechanism of chromanol-ring formation catalyzed by Tocopherol cyclase from *Anabaena variabilis* Kützing (Cyanobacteria).

Helvetica Chimica Acta 77, 1721-1737

Stocker, A., Fretz, H., Frick, H., Rüttimann, A. und Woggon, W.-D. (1996) The substrate specificity of Tocopherol cyclase.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 4, (7), 1129-1134

Subbaramaiah, K. und Simms, S.A. (1992) Photolabeling of CheR methyltransferase with S-adenosyl-L-methionine (AdoMet).

J. Biol. Chem. 267, 8636-8642

Suzuki, Y. J. und Packer, L. (1993) Inhibition of NF-KappaB activation by Vitamin E derivatives.

Biochem. Biophys. Research Comm. 193, 277-283

Tang, A. M., Graham, N. M. H., Semba, R. D. und Saah, A. J. (1997) Association between serum Vitamin A and E levels and HIV-1 disease progression.

AIDS 11, 613-620

Thies, W. (1997) Entwicklung von Ausgangsmaterial mit erhöhten alpha- oder gamma-Tocopherol-Gehalten in Samenöl für die Körnerraps-Züchtung. I. Quantitative Bestimmung der Tocopherole durch HPLC.

Angew. Bot. 71, 62-67

Thomson, I. M., Coltman, C. A. Jr. und Crowley, J. (1997) Chemoprevention of prostate cancer. The prostate cancer prevention trial.

Prostate 33, 217-221

Threlfall, D. R. (1971) The biosynthesis of Vitamin E and K and related compounds.

Vitam. Horm. 29, 153-196

van Niekerk, P. J. und Burger, A. E. C. (1985) The estimation of the composition of edible oil mixtures.

J. Am. Oil Chem. Soc. 62, 531-538

Wang, X. und Quinn, P. J. (1999) Vitamin E and its function in membranes.

Progress in Lipid Research 38, 309-336

Wang, Y. und Watson, R. R. (1994) Potential therapeutics of Vitamin E (Tocopherol) in AIDS and HIV.

Drugs 48, 327-338

Wefers, H. und Sies, H. (1988) The protection of Ascorbate and Glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on Vitamin E.

European Journal of Biochemistry 174, 353-357

Wessel, D. und Flügge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the Presence of detergents and lipids.

Anal. Biochem. 138, 141-143

Whistance, G. R. und Threlfall, D. R. (1970) Biosynthesis of phytoquinones. Homogentisic: a precursor of plastoquinones, Tocopherols and alpha-Tocopherolquinone in higher plants, green algae and blue-green algae.

Biochem. J. 117, 593-600

Whistance, G. R. und Threlfall, D. R. (1968) Biosynthesis of phytoquinones: utilization of homogentisic acid by maize shoots for the biosynthesis of plastoquinone.

Biochem. J. 108 (3), 482-483

Yoshida, H., Hirooka, N. und Kajimoto, G. (1990) Microwave Energy Effects on Quality of Some Seed Oils.

Journal of Food Science 55, 1412-1416

Yip, W. K., Dong, J. G., Kenny, J. W., Thompsom, G. A. und Yang, S. F. (1990) Characterization and sequencing of the active site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase.

Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 7930-7934

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Heldt danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Promotion und für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. Heise gilt mein Dank für seine Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft und für die kritische Revision der Dissertationsschrift.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Mock danke ich für die gewährte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während meines Aufenthaltes in Gatersleben.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Dieter Heineke bedanke ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Dr. Schlesier, Frau Dr. Katharina Pawlowski und Frau Dr. Sigrun Reumann bedanke ich mich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Ich sage danke bei allen Labormitarbeitern und –mitarbeiterinnen, die mir ein angenehmes Arbeitsklima in den 2 ½ Jahren meines Aufenthaltes in Gatersleben beschert haben. Besonders danke ich Elena Bartel, Andrea Maslak, Annegret Wolf, Barbara Kettig, Dorrina Kahl, Steffen Amme und Markus Ebneith.

Gerd Mader danke ich für die Hilfe beim Aufbau der HPLC in Göttingen.

Herrn Seibel aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen danke ich für die Bereitstellung von Laborkapazitäten für die Synthese der Tocopherolvorstufen und für die NMR-Analyse der Verbindungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für Biochemie der Pflanzen in Göttingen für die nette Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken, insbesondere bei Andrea Nickel, Mareike Bücken, Friedrich Kauder und Christian Knop.

Dr. Ralf Badur, Dr. Rainer Lemke, Frau Nagel und Frau Dehn danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen des durch die Firma SunGene finanzierten Projektes.

Zum Schluß möchte ich mich bei allen nicht namentlich genannten Personen bedanken, die durch ihre Unterstützung und Hilfestellung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Koch
Vorname: Maria
Geburtstag: 28.07.1973
Geburtsort: Leinefelde (Thüringen)

Schulbildung

1980-1990 Polytechnische Oberschule, Brehme, Abschluß: Mittlere Reife
1990-1992 Gymnasium, Leinefelde, Abschluß: Abitur

Studium

1992-1997 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
September 1994 Diplomvorprüfung in den Fächern: Allgemeine und Anorganische Chemie, Physikalische Chemie, Organische Chemie, Naturstoffchemie, Biochemie, Allgemeine Biologie, Physik
Sommer 1996 Diplomprüfung in den Fächern: Biochemie, Organische Chemie, Pflanzenphysiologie, Molekularbiologie
Oktober 1996-
Juli 1997 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema „Untersuchungen zur Konjugation von Gibberellin A₂₀ und A₃₄ sowie zum Metabolismus von Gibberellin A₂₀-13-O-glucoside in *Phaseolus coccineus* L.“

Promotion

seit 01.10.97 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Albrecht-von-Haller Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen
Mai 1998 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
seit 01.10.98 Forschungsaufenthalt im Rahmen der Promotion im Bereich Molekularbiologie des Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben