

Biosynthese, Akkumulation und Strukturen
von Styrylpyronen in gametophytischen
und sporophytischen Geweben von
Equisetum

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von Cornelia Beckert
aus
Welzheim

Würzburg 2002

eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

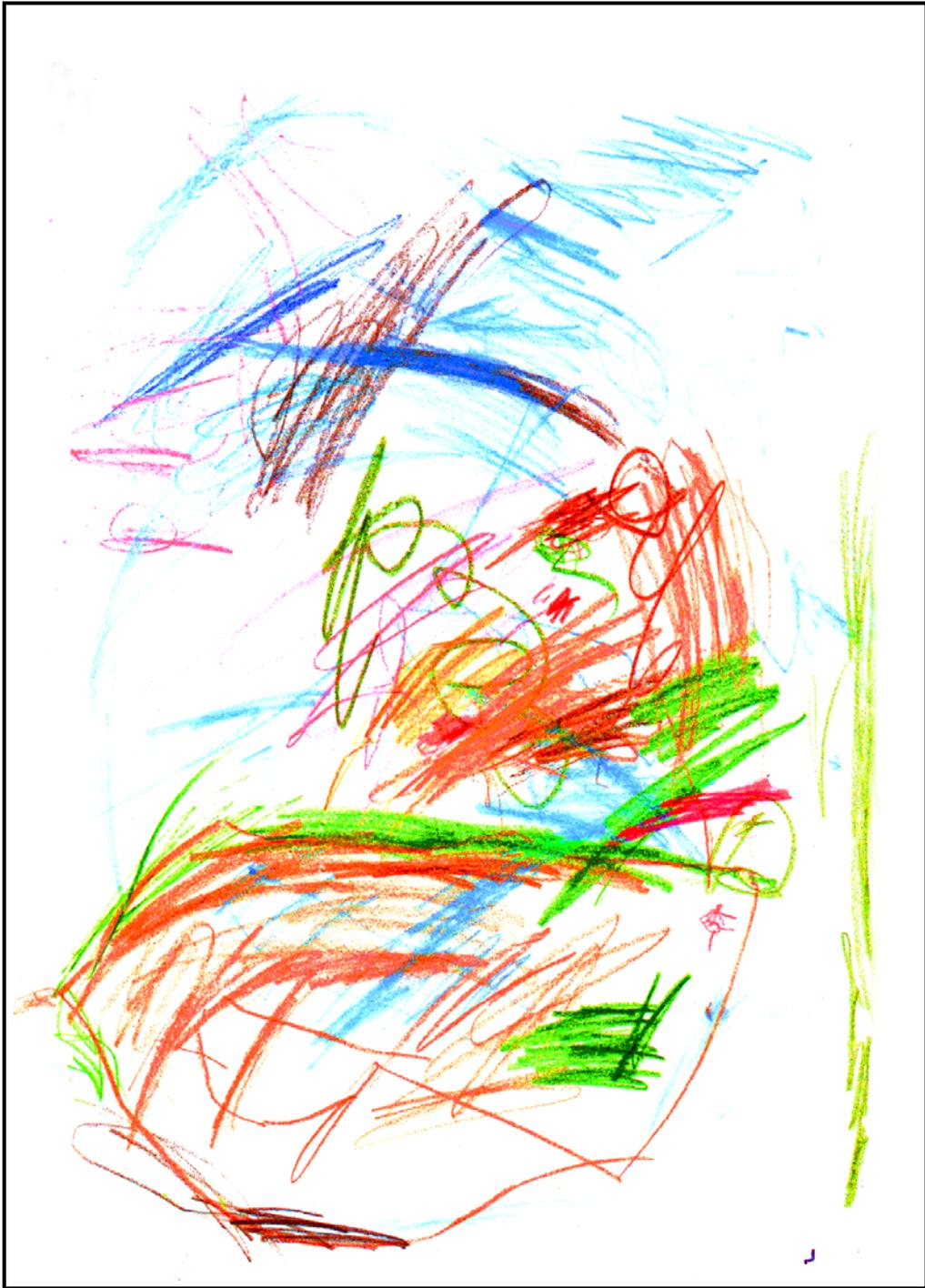
Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:



für Paul

Danksagung

Prof. Dr. Franz-Christian Czygan danke ich für die ermutigende Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg. Ihm verdanke ich, dass ich an seinem Lehrstuhl das vielschichtige und sehr fesselnde Thema bearbeiten konnte.

PD Dr. Markus Veit verdanke ich viele launige Bemerkungen, schöne Exkursionen und vor allem natürlich solide fachliche Unterstützung und Betreuung. Für die Stunden, die er für Lösungen von Problemen aufgewendet hat danke ihm sehr und ebenso für all die Stunden die er in der Küche verbracht hat, um auch mich mit seinen phänomenalen Kochkünsten zu verwöhnen. Viele Gerichte werden einfach unvergesslich bleiben

Für ihre tatkräftige unentbehrliche Unterstützung bei ganz kleinen Dingen bis hin zu mir sehr wichtigen Anliegen, in der ganzen Zeit, in der diese Arbeit entstand danke ich Almuth Krüger sehr sehr herzlich.

Dr. Werner Heller danke ich für jedes Gespräch. Sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit haben mir sehr geholfen. Ich bedanke mich für die Einführung in einige Methoden und für die Möglichkeit zur Durchführung verschiedener Messungen in seinem Arbeitskreis am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GSF, Neuherberg, ebenso für die Beschaffung diverser unentbehrlicher und unentgeltlicher Materialien.

Dr. Jörg-Peter Schnitzler und Dr. Andrea Lehning in Garmisch Partenkirchen am Fraunhofer Institut für Atmosphärische Umweltforschung haben mich in etlichen Fällen auf den richtigen Weg bei der Proteinreinigung gelotst. Ich bedanke mich bei Jörg-Peter Schnitzler für die Möglichkeit, dies in seiner Arbeitsgruppe zu erlernen, was mir bei den schwäbischen Anweisungen natürlich ungleich viel mehr "au Spass gmacht hat".

Andrea, meiner lieben verwandten Seele, danke ich für die schönen Wochen der Zusammenarbeit für ihr Engagement, ihre Hilfsbereitschaft und für die kritische Durchsicht von Teilen meiner Arbeit.

Prof. Dr. Dieter Strack am Institut für Pflanzenbiochemie Halle hat mir ermöglicht, in seiner Arbeitsgruppe verschiedene Techniken zu erlernen und auszuprobieren. Dr. Marianne Hohlfeld hat mich in die Feinheiten der Coenzym A-Ester Synthese eingewiesen und mir ihre Geheimnisse bei der Proteinextraktion aus *Equisetum* Gametophytenmaterial verraten. Ich danke ihr und ihrem Mann Dr. Hartwig Hohlfeld für die schöne Zeit der Zusammenarbeit dort in Halle.

Den lieben Menschen Dres. Ulrike Gräfe, Sonja Hesbacher, Sibylle Jennings, Joachim Kirch, Patricia Kreis, Arno Kunze, Irmgard van Rensen, Antje Sahm, Thomas van den Berg und Jörg Wittig danke ich für die angenehme, fröhliche Atmosphäre bei der Laborarbeit und für die Anregungen, die sich aus dieser Zusammenarbeit ergaben.

Bei den nicht namentlich aufgeführten Mitarbeiter des Instituts bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und ihre Kollegialität.

Arno Kunze bin ich besonders dankbar für seine detailliert kritische Prüfung der Dissertationsrohfassung.

Berenike Kast, Christian Horn und Birgit Welke danke ich für ihr sehr engagiertes Bearbeiten ihrer jeweiligen Dipolmarbeitsthemen. Mit ihren Diplomarbeiten haben sie selbstverständlich Grundlagen für diese Arbeit geliefert. Birgit Welke danke ich auch für die zur Verfügung gestellte Referenzsubstanz Hispidin, die sie während ihrer Diplomarbeitszeit synthetisiert hat.

Peter Hutzler und H. Voss von der GSF-München danke ich für ihre freundliche Bemühungen im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen während der Aufenthalte in München.

PD Dr. Markus Herderich vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg danke ich für die Aufnahme der HPLC-MS Spektren.

Dr. Ludgar Witte und Dr. Victor Wray danke ich für die Aufnahme der MS- bzw. der NMR-Spektren. Dankenswerte Hilfestellungen bei der Auswertung der NMR-Spektren haben Dr. Markus Veit, H. Wong, Dr. Ken Markham, Prof. Dr. Dieter Strack und Prof. Dr. Hans Geiger geleistet.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Gärtnern des Botanischen Gartens Würzburg für die Pflege der *Equisetum* Kultur.

Christian, meinem Mann, danke ich für seine guten Ideen, seine Geduld in vielen Dingen und für die Sisyphusarbeit, die er beim Layout dieser Arbeit geleistet hat.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich schließlich, dass sie die mir dieses Studium ermöglichten. Ohne deren stete Unterstützung wäre diese Arbeit nicht gelungen.

1	Einleitung	10
1.1	Einführung	10
1.2	Die Gattung Equisetum.....	12
1.2.1	Evolution der Schachtelhalme	14
1.2.2	Biologie der Schachtelhalme	15
1.2.3	Phenolische Sekundärstoffe	17
1.3	Styrylpyrone.....	20
1.3.1	Chemische Strukturen und Charakteristika	20
1.3.2	Vorkommen der Styrylpyrone im Pflanzenreich.....	23
1.3.3	Biosynthese	31
1.3.4	Stellung im Phenylpropanstoffwechsel	33
1.3.5	Pharmakologie und biologische Aktivität	39
2	MATERIAL und METHODEN.....	41
2.1	Materialien	41
2.2	Geräte.....	46
2.3	Sterilkulturen der Equisetum Gametophyten	48
2.4	Analyse phenolischer Inhaltsstoffe	49
2.4.1	Extraktion und Probenaufarbeitung löslicher Phenole.....	49
2.4.2	Präparation und Extraktion zellwandgebundener Phenole.....	50
2.4.3	HPLC-Analytik	52
2.4.4	Mikroskopie.....	54
2.4.5	Isolierung und Strukturaufklärung von Styrylpyronen	56
2.5	Synthese und Reinigung von Hydroxycinnamoyl-Coenzym A-Estern.....	61
2.6	Proteinbestimmung.....	66
2.7	Messung von Enzymaktivitäten	67
2.7.1	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	67
2.7.1.1	Extraktion der Styrylpyronsynthase aus Gametophyten, Sporophyten und Rhizomen	67
2.7.1.2	Isolierung von Mikrosomen.....	67
2.7.1.3	Extraktion der Glykosyltransferase aus Gametophyten	68
2.7.2	Styrylpyronsynthase	68
2.7.2.1	Test mit anschließender HPLC-Analytik und UV-Detektion	68
2.7.2.2	Optimierung der Proteinextraktionsbedingungen und der <i>in-vitro</i> Enzymtestbedingungen zum Nachweis einer Styrylpyronsynthase-Aktivität	69
2.7.2.3	Radiometrischer Test	71
2.7.2.4	Test mit anschließender HPLC–MS / MS-Detektion	72
2.7.2.5	DC-Detektion der entstandenen Reaktionsprodukte	73
2.7.3	β -Glykosyltransferase	73
2.7.3.1	Darstellung von 3-Hydroxyhispidin	73
2.7.3.2	Stabilisierung des 3-Hydroxyhispidins.....	73
2.7.3.3	Test auf β -Glykosyltransferase–Aktivität mit anschließender HPLC-Analytik und UV-Detektion.....	74

2.8	Charakterisierung der Styrylpyronsynthese	75
2.8.1	Stabilisierung der Proteinlösung	75
2.8.2	Temperaturabhängigkeit.....	76
2.8.3	pH-Wert-Abhängigkeit.....	76
2.8.4	Einfluss verschiedener Substanzen auf die SPS-Aktivität	76
2.8.5	Substratabhängigkeit und Bestimmung der K_m -Werte.....	77
2.8.6	Zeit- und Proteinabhängigkeit.....	77
2.8.7	Bestimmung des Molekulargewichtes	78
2.9	Proteinreinigung.....	79
2.9.1	Proteinextraktion (Reinigungsstufe 1)	80
2.9.2	Ammoniumsulfat-Fraktionierung (Reinigungsstufe 2).....	80
2.9.3	Ionenaustauschchromatographie (Reinigungsstufe 3)	80
2.9.4	Hydrophobe Interaktionschromatographie (Reinigungsstufe 4 und 5)	81
2.9.5	Gelfiltrationschromatographie	81
2.9.6	Hydroxylapatit	82
2.9.7	Hydrophobe Interaktionschromatographie an weiteren HIC-Medien	82
2.9.8	Ionenaustauschchromatographie an weiteren Materialien	83
2.10	Elektrophorese	83
2.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	83
2.10.2	Silberfärbung	84
3	Ergebnisse.....	87
3.1	Strukturaufklärung von Styrylpyronen.....	87
3.2	Phenolische Inhaltsstoffe der sporophytischen Gewebe	100
3.2.1	Muster der phenolischen Inhaltsstoffe in Rhizomen von <i>Equisetum arvense</i> L.	100
3.2.2	Untersuchungen steriler oberirdischer Sprossabschnitte von <i>Equisetum arvense</i> L. mit charakteristischen Gewebeverbräunungen.....	114
3.2.3	Zellwandgebundene Phenole	118
3.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Rhizomen und Prothallien der Gattung <i>Equisetum</i>	120
3.4	Phenolische Inhaltsstoffe der gametophytischen Gewebe	143
3.5	Enzymaktivitäten.....	146
3.5.1	Detektion der entstandenen Reaktionsprodukte bei Styrylpyronsynthese- Aktivität	146
3.5.2	Optimierung der Enzymextraktion und der <i>in-vitro</i> -Enzymtest-Bedingungen für die Styrylpyronsynthese aus Gametophyten von <i>Equisetum arvense</i> L.....	155

3.6	Charakterisierung der Styrylpyrongsynthase	162
3.6.1	Stabilisierung der Proteinlösung	162
3.6.2	Löslichkeit der Styrylpyrongsynthase-Aktivität.....	166
3.6.3	pH-Wert Abhängigkeit der Styrylpyrongsynthase	167
3.6.4	Temperaturabhängigkeit der Styrylpyrongsynthase	168
3.6.5	Zeit- und Proteinabhängigkeit.....	171
3.6.6	Einfluss verschiedener Substanzen auf die SPS-Aktivität.....	173
3.6.7	Substratabhängigkeit und Bestimmung der K_m -Werte für Kaffeoyl-CoA, <i>p</i> -Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA	176
3.6.8	Molekulargewicht	181
3.7	Chromatographische Reinigung der Styrylpyrongsynthase	183
3.7.1	Test und Optimierung einzelner chromatographischer Schritte.....	183
3.7.1.1	Gelfiltrationschromatographie.....	183
3.7.1.2	Chromatographie an Hydroxylapatit.....	187
3.7.1.3	Hydrophobe-Interaktionschromatographie (HIC).....	189
3.7.1.4	Ionenaustauschchromatographie	193
3.7.2	Reinigungssequenz für die Styrylpyrongsynthase.....	195
3.7.2.1	Zellernte und Aufschluss zur Rohextraktgewinnung (Reinigungsstufe 1)	195
3.7.2.2	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (Reinigungsstufe 2).....	195
3.7.2.3	Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose FF (Reinigungsstufe 3)	195
3.7.2.4	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butylsepharose (Reinigungsstufe 4)	197
3.7.2.5	Hydrophobe Interaktionschromatographie an RESOURCE Isopropyl (Reinigungsstufe 5)	198
3.7.2.6	Zusammenfassung der Reinigung der säulenchromatographischen Schritte	200
3.8	β -Glykosyltransferase	202
3.8.1	Enzymaktivitäten in Gametophyten	202
4	Diskussion	205
5	Zusammenfassung	217
6	Summary	221
7	Literatur	225
8	Anhang	238

Abkürzungsverzeichnis

APCI	atmospheric pressure chemical ionization	k_{av}	relative Mobilität der Eichproteine in der Glematrix
APS	Ammoniumpersulfat	K_m	Michaelis-Menten Konstante
<i>aq.</i>	aquatisch	LSM	laser scanning mikroskopie
Bq	Becquerel (Zerfälle pro Minute)	M	mol·L ⁻¹
BSA	bovine serum albumin	MES	(2N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
CD ₃ OD	Deuterium-Methanol	M_r	Molekulargewicht [g·mol ⁻¹]
CHS	Chalconsynthase	MS	Massenspektroskopie
C.I.d.U.	Chemisches Institut der Universität Würzburg	n	Stichprobenumfang
CoA	Coenzym A	NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
cpm	counts per minute	NOE	Nuclear Overhauser Effekt (NMR)
da	Dalton; atomare Masseneinheit	p.a.	pro analysi
	¹² C=12 Daltons; 1,66·10 ⁻²⁴ g	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
d.U.	der Universität	PEG	Polyethylenglycol
DAB 9/10	Deutsches Arzneibuch, 9./10. Ausgabe	pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
DC	Dünnschichtchromatographie	P _i	anorganisches Phosphat
DEAE	Diethylaminoethyl	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DEPT	Distorsionless Enhancement by Poulation Transfer (NMR)	ppm	parts per million
DMSO	Dimethylsulfoxid	PVPP	Polyvinyl-Polypyrrolidon
dpm	Zerfälle pro Minute	R _f -Wert	ratio of front Retention in der Dünnschichtchromatographie
DTT	Dithiothreitol	RP	reversed phase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RT	Raumtemperatur
ESI	electron spray ionisation (MS-Ionisationsverfahren)	s	Standardabweichung
FAB	fast atom bombardment (MS-Ionisationsverfahren)	SDS	Natriumdodecylsulfat
FG	Frischgewicht	SPS	Styrylpyronsynthase
FPLC	fast protein liquid chromatography	TEMED	N'-Tetramethylethylendiamin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m·s ⁻¹)	TFA	Trifluoressigsäure
HA	Hydroxylapatit	TG	Trockengewicht
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie	Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
HEPES	N-2-Hydroxylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	UDP	Uridin-5'-Diphosphat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	UV	ultraviolette Strahlung
HPLC-MS/MS	gekoppelte Analysenmethode aus HPLC und MS	V/V	volume/volume Volumenprozent
kat	Katal (Enzymaktivität: mol·s ⁻¹)	V _e	Elutionsvolumen
		VIS	visuelle Strahlung
		V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
		VT	Volumenteile
		w/V	weight/volume Gewichts/Volumen-Prozent
		w/w	weight/weight Gewichtsprozent
		λ	Wellenlänge

Abkürzungen, die nur in einzelnen Tabellen oder Abbildungen verwendet werden, sind in den jeweiligen Legenden erläutert.

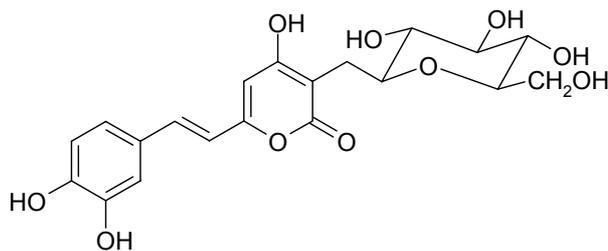
1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Die phytochemischen Untersuchungen an Sporophyten und Gametophyten von verschiedenen Schachtelhalmarten (Gattung *Equisetum*) sind der Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Aus Vertretern der Gattung *Equisetum* konnten neben Flavonoiden und Hydroxyzimtsäureestern Styrylpyronglucoside isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden (VEIT *et al.* 1990B, VEIT *et al.* 1991B, VEIT *et al.* 1992B, VEIT *et al.* 1993A, VEIT *et al.* 1993B, VEIT *et al.* 1995C).

Hauptkomponente ist das Equisetumpyron neben einigen am Styrylrest modifizierten Nebenkomponenten. Die Akkumulation dieser Substanzen erfolgt organspezifisch und hängt vom jeweiligen Entwicklungszustand der jeweiligen Gewebe ab. In hohen Konzentrationen konnten lösliche Styrylpyronglucoside nur in Rhizomen der Sporophyten und kultivierten Gametophyten nachgewiesen werden (VEIT *et al.* 1995B). Außerhalb der Gattung *Equisetum* wurden Styrylpyrone bisher nur in nicht glucosidierter Form in Pilzen sowie in wenigen Familien der höheren Pflanzen beschrieben (VEIT *et al.* 1993B).



Equisetumpyron

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biosynthese der Styrylpyrone untersucht. Alle bisherigen Untersuchungen zur Biosynthese von Styrylpyronen wurden an Pilzen über Inkubationsversuche mit Hilfe radioaktiv markierter Vorstufen durchgeführt (GILL und STEGLICH 1987, GILL 1994).

Der Beginn der Arbeit war der Nachweis des Enzyms Styrylpyronsynthase, die den ersten Schritt durch Kondensation eines Hydroxyzimtsäureesters mit Malonyl-CoA Molekülen in der Biosynthese der Styrylpyrone in *Equisetum* katalysiert. Im weiteren sollte das Enzym partiell aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden.

Viele Indizien deuten auf eine enge Verwandtschaft der Styrylpyronsynthase mit anderen Polyketidsynthasen hin. Faszinierend erscheint die Möglichkeit, die biochemische und evolutionäre Verwandtschaft der Chalconsynthase (Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese) und der Styrylpyronsynthase an *Equisetum arvense* und damit an einem Objekt untersuchen zu können. Die Faktoren, die für die Steuerung beider Biosynthesewege in *Equisetum* verantwortlich sind, sind bisher noch unbekannt. Die Equiseten bieten damit ein

ideales Modellsystem um Fragestellungen zur Evolution, Regulation und Funktionalität der Polyketidsynthasen ganz allgemein zu bearbeiten.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit waren die Untersuchungen zur Verbreitung und strukturellen Vielfalt der Styrylpyrone bei weiteren *Equisetum*-Arten. Styrylpyrone aus *Equisetum* zeigen starke strukturelle Ähnlichkeiten zu Kava Pyronen aus Rhizomen des Rauschpfeffers (*Piper methysticum*). Aus Kava Kava-Extrakten wurden in den letzten Jahren Arzneimittel gegen nervöse Angst und Unruhezustände entwickelt. Es ist vorstellbar, dass nach Hydrolyse der Zuckerbindung die Komponenten von *Equisetum* Rhizomen ähnliche pharmakologische Effekte zeigen könnten. Bei den vorliegenden Untersuchungen standen chemisch systematische und funktionelle Aspekte im Vordergrund:

- Die Identifizierung und Charakterisierung bisher noch unbekannter Komponenten.
- Das Aufspüren der zellulären und subzellulären Lokalisation von Styrylpyronen.
- Die Prüfung der Induzierbarkeit der Styrylpyronbiosynthese neben den konstitutiven Vorkommen in anderen Organen, besonders den grünen Sporophyten Sprossen.

1.2 Die Gattung Equisetum

Die Gattung *Equisetum* ist nach (FROHNE 1998) folgendermaßen in das System der Pflanzen eingeordnet:

Abteilung Pteridophyta – Farnartige Pflanzen
Klasse Equisetopsida – Schachtelhalmgewächse
Ordnung Equisetales
Familie Equisetaceae

Die typische Wuchsform der Schachtelhalme ist ein oberirdischer Sporophyt; unterirdisch findet man ein bewurzletes Rhizomgeflecht. Der Spross gliedert sich in aufeinanderfolgende Knoten (Nodien) und dazwischenliegenden gerippten Internodien. Die Rippen sind fest und besitzen in den Epidermiszellen Kieselsäureablagerungen, was die raue charakteristische Oberfläche ausmacht und die Equiseten von anderen Pteridophyten unterscheidet. Die kleinen schuppenförmigen Blätter (Microphyll) sitzen in Quirlen vereint an den Knoten. An ihrer Basis sind sie miteinander zu einer den Stängel umhüllenden Scheide verwachsen. Wenn Seitenzweige vorhanden sind, so entspringen sie nicht in den Blattachseln, sondern seitlich zwischen den Microphyllen (siehe Abbildung 1.2-1). Da die kleinen Blattspreiten sehr früh kein Chlorophyll mehr führen und somit nicht assimilieren, wird die Assimilation vom Spross übernommen.



Abbildung 1.2-1: *Equisetum arvense* L.: vegetativer Spross (links); fertile Sprosse mit kleineren vegetativen Sprossen in Topfkultur (rechts).

Bei *Equisetum* ist Homosporie die Regel. Die Sporangien befinden sich zu mehreren an der Unterseite von Sporophyllen, die an den Triebenden zu zapfenförmigen, endständigen Sporophyllständen vereinigt sind (siehe Abbildung 1.2-2)



Abbildung 1.2-2: *Equisetum arvense* L.; fertile Sprosse mit endständigen, zapfenförmigen Sporophyllständen.

Während die oberirdischen Triebe bei ungünstigen Jahreszeiten absterben können, sind die Rhizome ausdauernd. Zum Teil werden hier seitliche kurze Erdsprossäste zu rundlichen kaffeebohnen-großen reservestoffhaltigen Knollen ausgebildet.

Die fertilen Sprosse einiger Arten besitzen kein Chlorophyll und sterben nach der Sporenreife ab. Sie unterscheiden sich deutlich von den vegetativen Sprossen und erscheinen oftmals vor diesen im Frühjahr (dimorphe Arten; Vernalia). Bei anderen Arten entstehen die Sporophyllstände an der Spitze normaler vegetativer Sprosse (monomorphe Arten; Aestivalia). Bei wieder anderen Arten sterben die im Frühjahr erscheinenden fertilen Triebe mit den endständigen Sporangien nicht ab sondern verzweigen sich von der Spitze her und ergrünen nach der Sporenreife relativ schnell (semidimorphe Arten; Subvernalialia).

Die Gattung lässt sich noch weiter anhand morphologischer Merkmale wie der Spaltöffnungen, der Strobili-Achse und der Morphologie des Gametophyten in die Subgenera *Equisetum* und *Hippochaete* unterteilen (HAUCKE 1978, PAGE 1974).

1.2.1 Evolution der Schachtelhalme

Die Schachtelhalme gehören zu den ältesten Landpflanzen die es heute noch auf der Erde gibt und können zu den lebenden Fossilien gezählt werden.

Schachtelhalmähnliche Pflanzen wie *Hyenia elegans* (S. LECTERCQ 1940) sind mit Sicherheit seit dem Mittleren Devon bekannt. Es handelt sich um etwa 30 cm hohe sterile Triebe und Triebe mit quirlförmig angeordneten sporangientragenden Sporophyllen. Sie tauchen etwa 50 Millionen Jahre nach den ersten bekannten Gefäßpflanzen gegen Ende des Silur vor 408 Millionen Jahren als Landpflanzen auf. Die Riesenformen der Equiseten aus der Familie der Calamitaceae machten vor ungefähr 300 Mio. Jahren die Sümpfe im Karbon zu Wäldern. Die ersten Fossilbelege von *Equisetum* und *Equisetites* gibt es aus dem Mittleren Perm und folgend aus dem ganzen Pleistocän. *Equisetites* werden all die Fossilien zugeordnet, die eine den *Equisetum* entsprechende Blattscheide aufweisen. Als *Equisetum* werden Fossilien aus dem Kanäozoikum dann bezeichnet, wenn sie von den heutigen rezenten Arten nicht unterschieden werden können. Die meisten Arten der Equisetaceae traten in der Trias und im Jura vor etwa 200-190 Millionen Jahren auf. Zur Zeit wird angenommen, dass *Equisetum* direkt von den baumförmigen Calamiten abstammt, verbunden mit einer Größenreduktion, Bildung einer Blattscheide, Verlust der Sekundärholzbildung und Verlust der quirligen Anordnung der sterilen Deckblätter in den zapfenförmigen Sporophyllständen (PRYER 2001, STANLEY 1994, WILSON 1993).

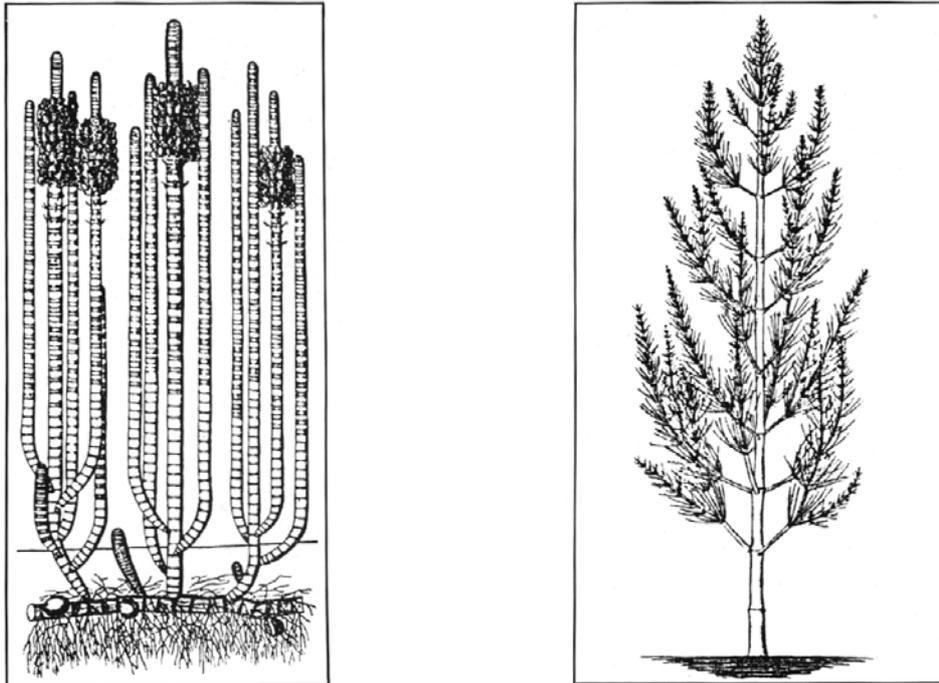


Abbildung 1.2-3: Rekonstruktionen von a) *Equisetites arenaceus* und b) *Neocalamites merianii* (aus (FRENTZEN 1934)).

1.2.2 Biologie der Schachtelhalme

Der Reproduktionsmodus der Schachtelhalme ist, wie für alle Pteridophyten typisch, durch die Aufeinanderfolge zweier selbständiger Generationen charakterisiert: die Gametophyten und die Sporophyten.

Die Gametophyten (Prothallien) von *Equisetum* sind grün und freilebend; meist sind sie stecknadelkopfgross mit farblosen Rhizoiden und entwickeln sich aus den keimenden Meiosporen. In der Natur können nach 4 - 6 Wochen Archegonien (weibliche Organe) und Antheridien (männliche Organe), in der Regel auf verschiedenen Individuen ausgebildet werden, wobei die Anzahl der weiblichen Individuen überwiegt. Die schraubenförmigen Spermatozoiden, gebildet in den Antheridien, besitzen zahlreiche Geißeln und benötigen Wasser um zur Eizelle zu gelangen. Auf einem Gametophyten können die Eizellen mehrerer Archegonien befruchtet werden und zu diploiden Embryonen (junge Sporophyten) heranwachsen. Hat dieser die ersten Wurzeln ausgebildet, stirbt der Gametophyt ab. Die vegetative Vermehrung über Rhizombruchstücke ist aber neben dieser generativen Vermehrung eher die Regel. Dargestellt ist dieser biphasische Generationszyklus in Abbildung 1.2-4 (DUCKETT 1979).

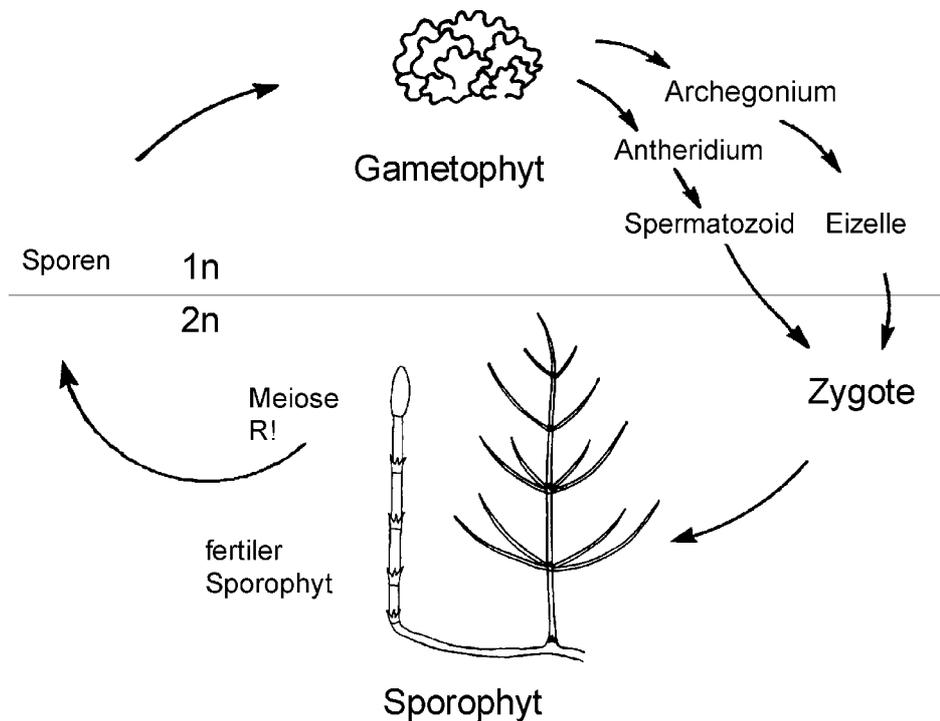


Abbildung 1.2-4: Generationswechsel der Equiseten.

Ein wichtiger Aspekt für die Abklärung systematischer Zusammenhänge der Equisetaceae ist die Hybridisierung. Man kann annehmen, dass näher miteinander verwandte Arten eher miteinander hybridisieren können, als solche die weniger nah verwandt sind (DUCKETT 1979, PAGE 1982). Im Genus *Equisetum* wurden 17 natürlich vorkommende Hybriden beschrieben. Die Hybriden sind morphologisch nicht immer intermediär. Da auch Hybriden in ihrem Phänotyp ähnlich variabel wie alle Schachtelhalme sind, ist eine einfache Klassifizierung nicht immer möglich. Umweltfaktoren bewirken diesen Polymorphismus. Zum Beispiel ähnelt *Equisetum x litorale* KÜHL EX RUP, eine sehr konkurrenzfähige Hybride aus *E. arvense* L. (Ackerschachtelhalm) und *E. fluviatile* L. (Teichschachtelhalm) je nach Standort dem einen oder dem anderen Elternteil (PAGE 1982, PAGE und BARKER 1985).

E. arvense gilt als Kosmopolit, daneben gibt es weitere weltweit verbreitete Arten (je nach Autor 31 oder 14), die jedoch nicht in Australien und Neuseeland vorkommen. Sehr wenige Arten (z.B. *E. giganteum* L.) findet man in den tropischen Regionen. Equiseten sind in der Regel Sumpfpflanzen oder terrestrisch. *E. fluviatile* wird jedoch als Pionierpflanze bezeichnet, sie wächst in der Verlandungszone von Gewässern der gemäßigten Zonen der Nordhemisphäre (KRAMER 1995).

1.2.3 Phenolische Sekundärstoffe

In Europa, Asien und Nordamerika spielt *Equisetum arvense* L. seit alters her als diuretisch wirksame Heilpflanze eine Rolle. Sie ist Bestandteil der meisten europäischen Pharmakopöen. In Deutschland hat die Kommission E (Phytotherapie) des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte eine Positivmonographie verabschiedet. Für keine der genannten Indikationsgebiete sind spezifische Wirkstoffe bekannt, die Angabe beruht ausschließlich auf Überlieferung und langjährige Erfahrung. Die Qualitätskontrolle und Standardisierung von Drogenmaterial erfolgt meistens anhand der Flavonoidmuster (VEIT 1994). Von daher ist die Akkumulation löslicher Phenole in der Gattung *Equisetum* umfassend untersucht worden. Mittlerweile konnten alle Substanzen identifiziert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Es handelt sich um verschiedene Kaffeesäurekonjugate, Flavone, Flavonole und Styrylpyrone.

Bekannte Kaffeesäurekonjugate sind Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure, die in großen Mengen als typische Komponente in sterilen Sprossen von *E. arvense* akkumuliert wird (VEIT *et al.* 1995B). 5-O-Kaffeoylshikimisäure, die im Frühjahr in Sporophyten von *E. arvense* akkumuliert wird, Chlorogensäure (Kaffeoyl-5-O-D-Chinasäure), die bei *E. arvense* und *E. fluviatile* L. vorkommt, und Monokaffeoyl-*meso*-weinsäure, die auch in weiteren Arten der Gattung *Equisetum* nachgewiesen ist (siehe Abbildung 1.2-5).

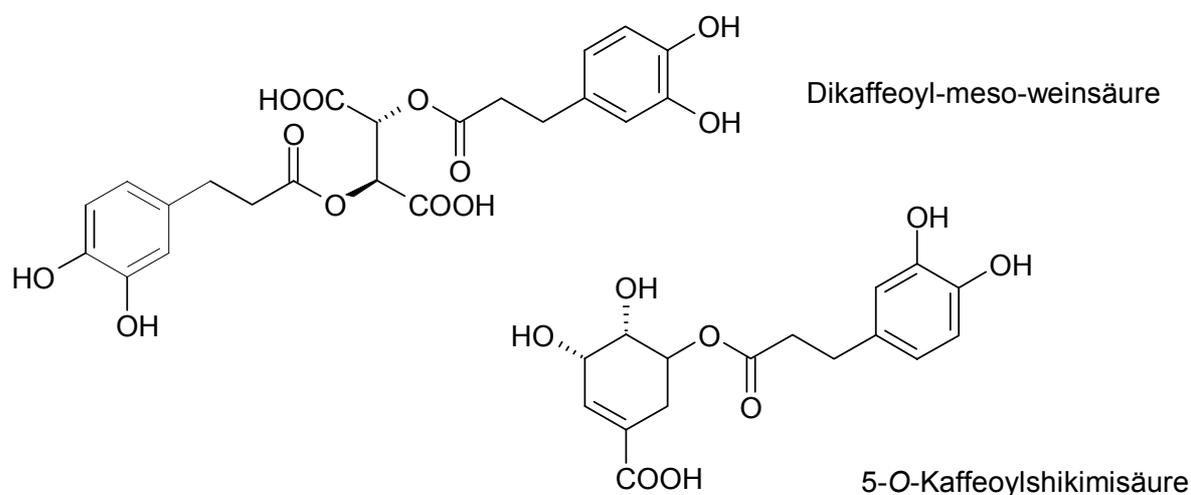


Abbildung 1.2-5: Hydroxyzimtsäurederivate in *Equisetum*.

Die Flavonoide werden ausschließlich als Glykoside akkumuliert, detektierte Aglykone können als Artefakte bezeichnet werden, die zum Beispiel bei langer Lagerung der Droge bzw. der Pflanzen auftauchen (VEIT *et al.* 1995B). In den Sprossen werden Glykoside der Flavonol-Aglykone Quercetin, Kämpferol und Gossypetin, der Flavon-Aglykone Apigenin, Genkwain, Luteolin und Protogenkwain detektiert. In Position C3 und C7 sind Verknüpfungen mit den Zuckern Glukose, Rhamnose, Rutinose und Sophorose bekannt. Die Diversität der Inhaltsstoffmuster wird zusätzlich durch Modifikationen der Zuckerkomponente erhöht.

Bekannt sind Acetylierung und Malonylierung der Glukose in Position C6'' (siehe Strukturformel in Abbildung 1.2-6).

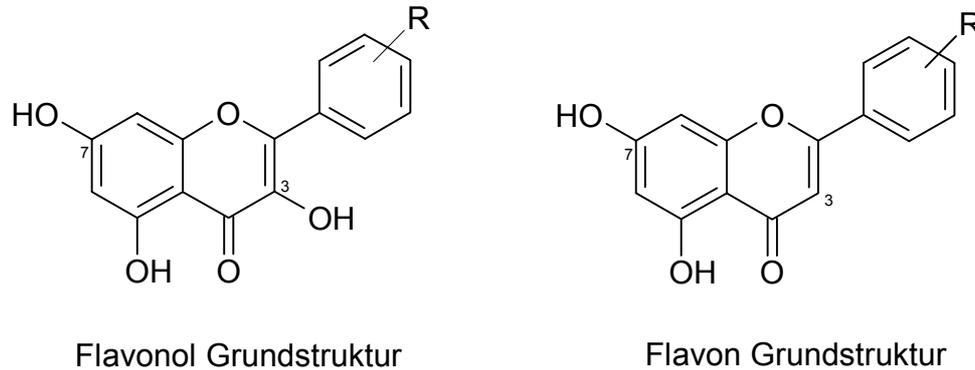


Abbildung 1.2-6: Flavonol- und Flavon Grundstruktur.

Für die Equiseten sind die Flavonoidmuster der Sprosse arttypisch und zeigen bei den meisten Arten nur geringe intraspezifische Variationen, während *E. arvense* ein Muster mit größter Diversität zeigt. Dabei lassen sich in Abhängigkeit der geographischen Herkunft zwei distinkte Chemodeme unterscheiden. Auch bei Hybriden können die Flavonoidmuster zur Identifizierung beitragen, da sich deren Muster additiv oder intermediär zu denen der Elternarten zusammensetzen (VEIT *et al.* 1995A).

Die Sekundärstoffmuster anderer Organe und Entwicklungsformen von *E. arvense* unterscheiden sich deutlich: während Hydroxyzimtsäurederivate in allen Geweben gefunden werden, akkumulieren Flavonoide außer in Sporen nur in diploiden Geweben, in Gametophyten und Rhizomen dagegen werden Styrylpyrone detektiert. Eine Verteilung der Stoffgruppen in den einzelnen Geweben ist in Tabelle 1.2-1 aufgeführt.

Im Generationszyklus erfolgt ein Wechsel von der Styrylpyron- zur Flavonoidbiosynthese. In den haploiden Gametophyten, Rhizomen und fertilen Sporophyten werden Styrylpyrone akkumuliert, während in den sterilen oberirdischen Sprossen Flavonoide akkumuliert werden (VEIT *et al.* 1995C). Die Strukturen der Styrylpyrone werden in 1.3.1 ausführlich beschrieben.

Tabelle 1.2-1: Verteilung der sekundären Inhaltsstoffe Flavonoide, Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate (HZS-Derivate) in verschiedenen Organen/Entwicklungsstufen von *Equisetum arvense*. In den Klammern ist der jeweilige Chromosomensatz der Organe angegeben. /: Substanzgruppe nicht detektiert.

Entwicklungsform / Organ	sekundäre Inhaltsstoffe		
fertiler Spross (2n)	Flavonoide	Styrylpyrone	HZS-Derivate
steriler oberirdischer Spross (2n)	Flavonoide	/	HZS-Derivate
Rhizom (2n)	/	Styrylpyrone	HZS-Derivate
Prothallium (1n)	/	Styrylpyrone	HZS-Derivate
Sporen (1n)	Flavonoide	/	HZS-Derivate

1.3 Styrylpyrone

1.3.1 Chemische Strukturen und Charakteristika

Die Grundstruktur der Styrylpyrone besteht aus einem Styrylteil, der mit einem Pyronring verknüpft ist (Abbildung 1.3-1).

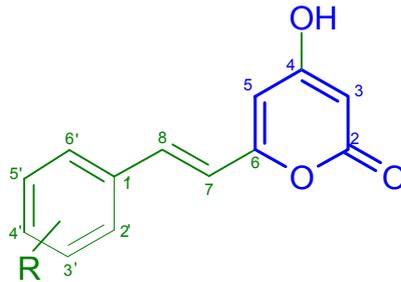


Abbildung 1.3-1: Grundstruktur der Styrylpyrone. normal: Styrylteil des Moleküls, fett: Pyronring des Moleküls.

Bekannt sind Modifikationen sowohl am Pyronring als auch am Styrylteil des Moleküls. Beschrieben werden unter anderem Hydroxylierungen, Methylierungen und Dehydrierungen sowohl am Pyronteil als auch am Styrylteil des Moleküls sowie verschiedene Dimerbildungen. Abbildung 1.3-2 und Abbildung 1.3-3 soll die Vielfalt der bisher bekannten Modifikationen verdeutlichen. Bei den Styrylpyronpigmenten handelt es sich meist um gelbe, weiße bzw. farblose Nadeln oder grüngelbe prismatische Kristalle mit einem Schmelzpunkt zwischen 111-244° C. Die Pigmente weisen meist zwei Absorptionsmaxima auf (siehe Tabelle 1.3-1).

Tabelle 1.3-1: Auflistung einiger Charakteristika wie Kristallform und Farbe, Schmelzpunkt und Absorptionsmaxima verschiedener Styrylpyrone. /: keine Angaben. Die in Klammern gesetzten Zahlen verweisen auf die abgebildeten Strukturformeln.

Substanz	Kristalle	ΔT [° C]	$\lambda_{\max 1}$ $\lambda_{\max 2}$	Referenz
Hispidin (6)	gelbe Nadeln	259	257; 373 nm (in Ethanol)	(EDWARDS 1961, HATFIELD und BRADY 1971, FIASSON 1977A)
Bisnoryangonin (7)	gelbe Nadeln	240-244	217; 364 nm (in Ethanol)	(HATFIELD und BRADY 1968, 1969)
Kawain (7)	gelbe Nadeln	106	/	(KELLER und KLOHS 1963)
Goniotriol (20)	weiße Nadeln	170	215 nm	(ALKOFAHI <i>et al.</i> 1989)
Fasciculin A (27)	farblose Nadeln	/	285; 349 nm (in Methanol)	(FIASSON 1977A)
Yangonin (1)	grüngelbe pris- matische Kristalle	155- 156,5	/	(KELLER und KLOHS 1963)

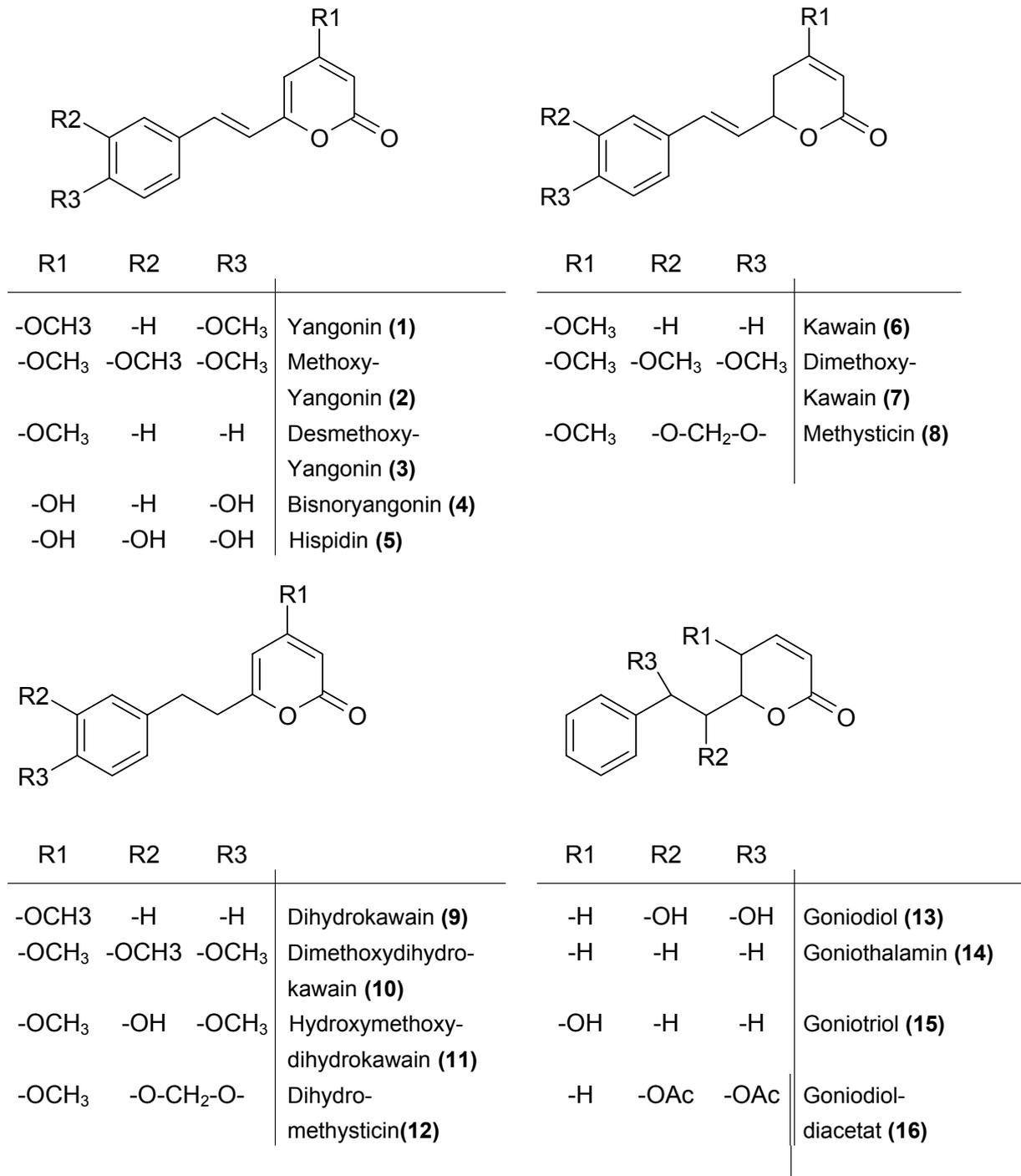
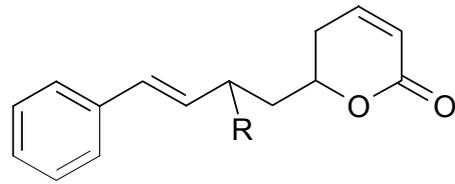
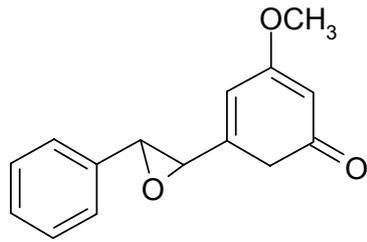


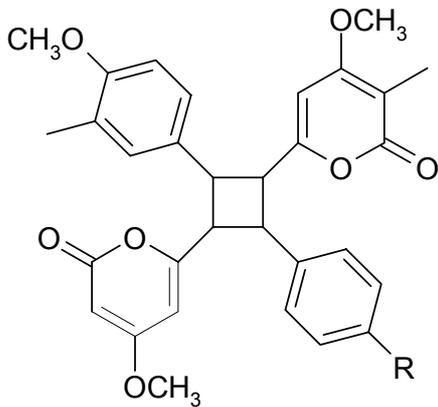
Abbildung 1.3-2: Darstellung unterschiedlicher Styrylpyronstrukturen und ihre Modifikationen.



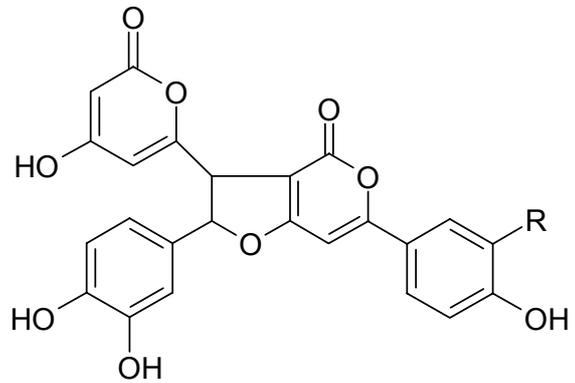
7,8-Epoxy-5,6-Dehydrokawain (**17**)

R	
-OAc	Cryptocaryalacton (18)
-OH	6-(2-Hydroxy-4-Phenyl-3-Butenyl)-5,6-Dihydropyranon (19)

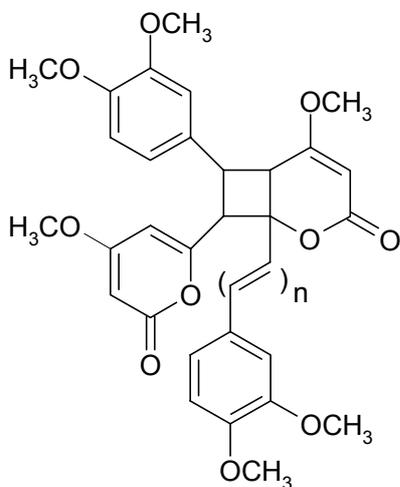
Fortsetzung Abbildung 1.3-2: Darstellung unterschiedlicher Styrylpyronstrukturen und ihre Modifikationen.



R	
-H	Trux-Yangonin I (20)
-OCH ₃	Trux-Yangonin II (21)



R	
-H	Fasciculin A (22)
-OH	Fasciculin B (23)



n
1 Anibadimer A
2 Anibadimer B

Abbildung 1.3-3: Strukturen verschiedener Styrylpyrondimere.

1.3.2 Vorkommen der Styrylpyrone im Pflanzenreich

Styrylpyrone in Pilzen

Styrylpyrone sind bei Fungi besonders für die Familie der Hymenochaetaceae charakteristisch, aber im Vorkommen nicht auf diese Familie beschränkt, sondern auch für andere Familien bekannt, z.B. Strophariaceae (BRADY und BENEDICT 1972, FIASSON 1982, HEGNAUER 1989). Es handelt sich dabei vor allem um Arten der Gattungen *Polyporus*, *Gymnopilus*, *Hypholoma* und *Pholita* (GILL und STEGLICH 1987). Als erstes Styrylpyron aus Pilzen konnte Hispidin (**5**) 1889 von ZOPF (ZOPF 1889) und 1920 von ZELLNER (ZELLNER 1920) isoliert werden. Die Strukturaufklärung dieser Substanz gelang unabhängig voneinander 1961 (EDWARDS 1961, BU`LOCK und SMITH 1961).

Neben Bisnoryangonin (**4**) als weiteres Styrylpyronmonomer sind nur Hymenochinon (**26**) (KLAAR und STEGLICH 1977B) und das entsprechende Hydrochinon Leucohymenochinon (**27**) aus *Hymenochaete mougeouti* und *H. pinnatifida* bekannt (GILL und STEGLICH 1987), siehe Abbildung 1.3-4. Während der Sporophorenreifung wird Hispidin weiter enzymatisch oxidiert. Die resultierenden schwarz-braun gefärbten Polymere liegen zellwandgebunden vor und verleihen den reifenden Sporophoren die charakteristische Farbe. Diese Polymere werden wegen funktioneller und struktureller Ähnlichkeiten als sogenannte pilzliche Lignine diskutiert. Neben Hispidin als pilzliches Lignin-Strukturelement sind im Unterschied zu pflanzlichen Ligninen methylierte Monomere ebenso nachweisbar (BRADY und BENEDICT 1972, BU`LOCK und SMITH 1961, BU`LOCK 1962, KIRK *et al.* 1975, TOWERS 1969). Daneben wurden zahlreiche Dipyrone beschrieben, deren Biosynthese wahrscheinlich über eine initiale Oxidation des Hispidins zu Dehydrohispidin erfolgt. Durch Kondensationsreaktionen des Hispidins können Dipyrone, die sogenannten Hypholomine (**28**, **29**) und Fasciculine (**22**, **23**) entstehen (FIASSON 1977B) (Abbildung 1.3-3 und Abbildung 1.3-4). Verknüpfungen des Hispidins zu anders strukturierten Dimeren (siehe (**30**) (**31**) Abbildung 1.3-4) sind weiterhin bekannt (GILL und STEGLICH 1987). Auch höher vinyloge Substanzen mit Styrylpyroncharakter konnten in Pilzen nachgewiesen werden, z.B. Geogenin (**32**), aus *Hydnellum geogenium* (STEGLICH 1979) (Abbildung 1.3-4).

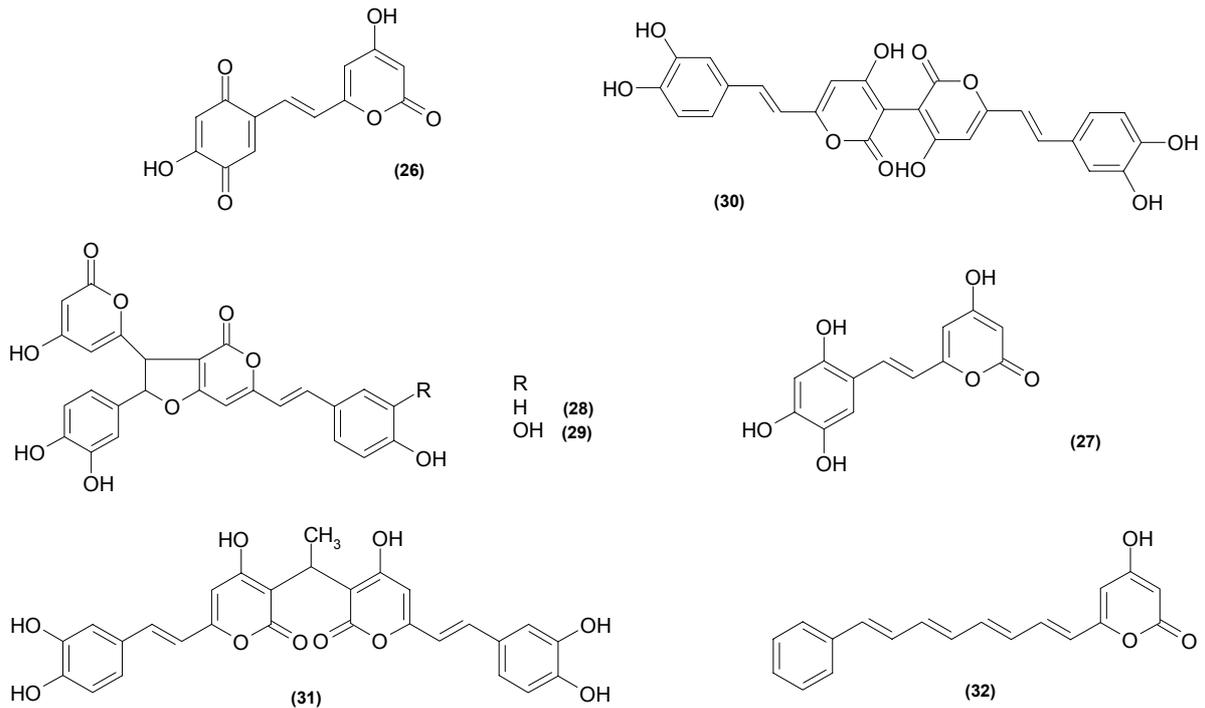


Abbildung 1.3-4: Styrylpyrone aus Pilzen: Hymenochinon **(26)**, Leucohymenochinon **(27)**, Hypholomin A **(28)**, Hypholomin B **(29)**, ein 3,3'-verknüpftes Dehydro-Dimer **(30)**, ein 1,1-Distyrylpyrylethan **(31)**, Geogenin **(32)**.

Styrylpyrone in Farnpflanzen

In der Gattung *Equisetum* wurden erstmals verschiedene Styrylpyrone in glucosidierter Form isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Außerhalb der Gattung wurden Styrylpyrone bisher nur in nichtglykosidierter Form beschrieben. Hauptkomponente ist das Equisetumpyron **(33)** neben einigen am Styrylrest modifizierten Nebenkomponenten (z. B. **(34)**, **(35)**) in Abbildung 1.3-5; VEIT *et al.* 1993B, VEIT *et al.* 1995C). β -D-Glucose ist an C3 über eine O-glucosidische Verbindung verknüpft. Eine Hydroxylierung in Position 3 tritt ebenfalls bei keinem anderen, der aus anderen Familien isolierten Pyrone auf. Styrylpyrone werden bei *Equisetum arvense* L. in sporophytischen Geweben, in Rhizomen, fertilen Sprossen und in den gametophytischen Geweben der Prothallien akkumuliert, während sie in sterilen Sporophyten fehlen (VEIT *et al.* 1992A). Das Vorkommen eines Arylpyron-Styrylpyron-Dimer, Davallialacton **(36)**, aus der Gattung *Davallia* (CUI *et al.* 1992), deutet daraufhin, dass neben den Equiseten möglicherweise auch Farne Styrylpyrone akkumulieren. Einzelne Strukturformeln zeigt Abbildung 1.3-5.

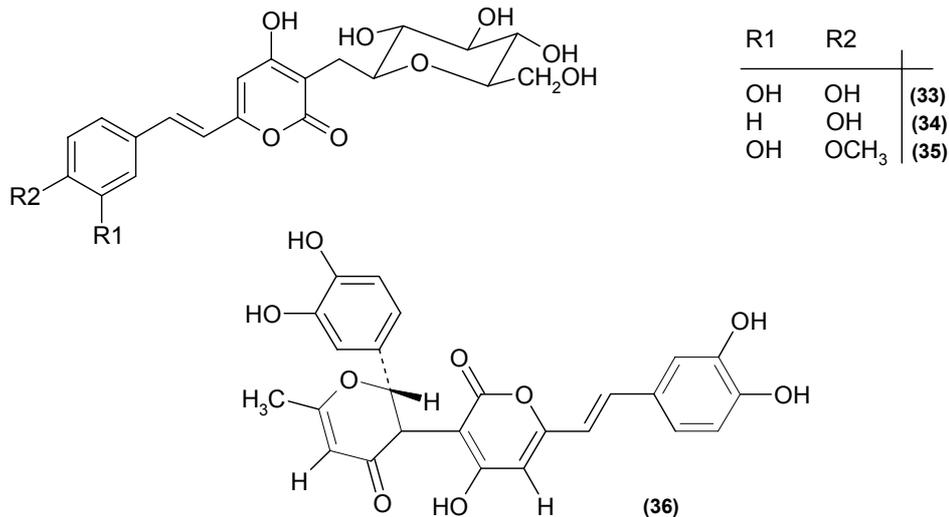


Abbildung 1.3-5: Styrylpyrone aus Farnpflanzen.

Styrylpyronvorkommen in höheren Pflanzen

Styrylpyrone sind bisher vor allem in primitiveren Angiospermen, in den Familien Piperaceae, Lauraceae, Annonaceae, Ranunculaceae, Fabaceae, Gesneriaceae, Asteraceae, Polygalaceae sowie in Zingiberaceae nachgewiesen, außerdem sind sie als Phytoalexine in der Familie Fabaceae bekannt.

Piperaceae

Seit James Cook 1768 von einem berauschenden Trank, der aus dem Rauschpfeffer, *Piper methysticum* gewonnen werden kann, von seinen Reisen in die Südsee berichtete, sind die Inhaltsstoffe und deren pharmakologische Wirkungen näher untersucht worden (KELLER und KLOHS 1963). Folgende Kawapyrone konnten bisher in den Piperaceae aufgeklärt werden: Methysticin (**8**) war die erste Substanz die aus Wurzelextrakten des Rauschpfeffers (*Piper methysticum*) von GOBLEY und O'RORKE (GOBLEY 1860, O'RORKE 1860) beschrieben wurde. Es folgten Yangonin (**1**) (BORSCHKE und GERHARDT, 1914, LEWIN 1886, NÖLTING 1874), Dihydromethysticin (**12**) (BORSCHKE 1929), Kawain (**6**) und Dihydrokawain (**9**) (BORSCHKE 1930), 11-Methoxyyangonin (**2**) und 5,6-Dehydromethysticin (**37**) (MORS *et al.* 1962). Durch Anwendung gaschromatographischer Trennungen konnten Dihydrokawain-5-ol (**38**) und Tetrahydroyangonin (**39**) identifiziert werden (ACHENBACH 1971). Inzwischen sind weitere Pyrone aus dieser Art bekannt: 11,12-Dimethoxydihydrokawain (**10**), 11-Hydroxy,12-Methoxydihydrokawain (**11**) (ACHENBACH 1972), 5,6-Dihydroyangonin (**40**) (DUVE 1981) und Desmethoxyyangonin (**3**) (SMITH 1983). Auch in *Piper methysticum* wurden Dimere strukturaufgeklärt, es handelt sich dabei um dimere Yangonine: Trux-Yangonin I (**20**), Trux-Yangonin II (**21**) und Trux-Yangonin III (**41**) (HÄNSEL 1996). Aus einer endemischen *Piper* Art

Neu Guineas, *Piper spec.*, wurde 1966 neben aus *P. methysticum* bekannten Styrylpyronen ein Derivat des Yangonins beschrieben: 11-Methoxy-12-noryangonin (**42**) (HÄNSEL *et al.* 1966). Aus nicht näher bezeichneten *Piper*-Arten sind Dihydro-5,6-Dehydrokawain (**43**) und 7,8-Dihydroyangonin (**44**) beschrieben worden (BANERJI *et al.* 1980). 1967 wurde von SAUER 11-Hydroxy-12-Methoxynoryangonin (**45**) aus *Piper sanctum* beschrieben (SAUER und HÄNSEL 1967). 5-Methoxy-5,6-dehydromethysticin (**46**), 5-Acetoxy-6-methoxykawain (**47**) und 5-Hydroxy-6-Methoxykawain (**48**) aus Wurzelholz des *Piper sanctum*, mit ebenfalls kawapyronähnlichen pharmakologischen Wirkungen sind von HÄNSEL *et al.* 1973, 1976 bzw. 1982 isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt worden (HÄNSEL *et al.* 1973, HÄNSEL *et al.* 1976, HÄNSEL 1982).

Ranunculaceae

Yangonin (**1**), bisher nur für die Piperaceae beschrieben, wurde 1972 während einer Isolierungsarbeit an *Ranunculus quelpartensis*, ebenfalls nachgewiesen. Dieses Vorkommen könnte bei chemotaxonomischen Betrachtungen von Interesse sein (SHIBATA *et al.* 1972).

Lauraceae

In den Lauraceae wurden Isolierungs- und Strukturaufklärungsarbeiten an verschiedenen *Aniba*-Arten vor allem von BITTENCOURT *et al.* durchgeführt (GOTTLIEB 1972, ROSSI 1997, SAUER und HÄNSEL 1967). Verschiedene 6-Styryl-4-methoxy-2-pyrone (**37**), (**3**), (**2**), (**45**), und 6-Styryl-2-pyrone (**49**) (**50**) (**51**) (**52**) (**53**) sind für *Aniba*-Arten charakteristisch (BARBOSA-FILHO *et al.* 1987, BITTENCOURT *et al.* 1971, DA MATA REZENDE *et al.* 1971, GOTTLIEB *et al.* 1975, MOTIDOME *et al.* 1982, TALAPATRA *et al.* 1985A). Des Weiteren sind Dihydrokawain (**9**), Dihydromethysticin (**12**), Tetrahydroyangonin (**39**) und Tetrahydro-11-Methoxy-Yangonin (**54**) für *Aniba gigantifolia* beschrieben (FRANCA *et al.* 1973). *Aniba coto* und *Aniba pseudocoto* sind zwei bekannte Arten, die keine Styrylpyrone enthalten, sondern mit dieser Substanzklasse verwandte Arylpyrone (siehe Abschnitt 1.3.4) besitzen (GOTTLIEB 1972). ANDRADE DA MATA *et al.* konnten zum ersten Mal Styrylpyrondimere, Anibadimer A (**24**) und Anibadimer B (**25**) in höheren Pflanzen nachweisen, isolieren und ihre Struktur aufklären (DA MATA REZENDE *et al.* 1971). Dabei ist interessant, dass eine Dimerisierungsreaktion *in vitro* unter Sonneneinstrahlung oder unter Einfluss von Kunstlicht mit Bildung dieser Substanzen aus entsprechenden Monomeren beschrieben wurde (MOTIDOME *et al.* 1982). Anibadimer A (**24**) kann dabei ausgehend von 6-*trans*-Styryl-4-methoxy-2-Pyron gebildet werden. Bei einer Mischung aus 6-*trans*-Styryl-4-methoxy-2-pyron und 6-Phenyl-4-methoxy-2-pyron entsteht unter gleichen Bedingungen Anibadimer A und B zusammen mit 6-*cis*-Styryl-4-methoxy-2-Pyron.

Aus *Cryptocarya caloneura*, ebenfalls *Lauraceae* wurde 6-Styryl-5S-5,6-dihydro-2-pyron (**14**) isoliert (HLUBUCEK und ROBERTSON 1967). Dieses Pyron unterscheidet sich in der Hydrierung an Position 5 und 6 von den aus *Aniba*-Arten beschriebenen Styrylpyronen. Es entspricht Goniothalamin (**14**), das später für verschiedene *Goniothalamus*-Arten (Annonaceae) beschrieben wurde. Auch höher vinyloge Laktone mit Pyroncharakter wurden für diese Gattung beschrieben (**18**) (**19**) (**55**). Es handelt sich dabei um Cryptocaryalacton (**18**),

6-(2-Hydroxy-4-phenyl-3-5,6-dihydro-2)-Pyranon (**19**) und Kurzilacton (**55**) (FU *et al.* 1993, GOVINDACHARI und PARTHASARATHY 1971, GOVINDACHARI 1971, HLUBUCEK und ROBERTSON 1967).

Annonaceae

Die meisten aus den Annonaceae bekannten Styrylpyrone unterscheiden sich durch Hydrierung in Position 7 und 8 von den bisher beschriebenen Strukturen. Die Styryllactone der *Goniothalamus*-Spezies werden anhand des Oxidationsgrades der aliphatischen Kette und der Sättigung des Pyronteil der Moleküle in vier Typen eingeteilt: 1. 7,8-Oleofin Styrylpyrone, 2. 7,8-Epoxy-Styrylpyrone, 3. 7,8 dioxxygenierte Styrylpyrone und 4. gesättigte Styrylpyrone. (BLAZQUEZ 1999). Als erstes bioaktives Styrylpyron aus *Goniothalamus*-Arten wurde Goniothalamin (**14**) aus *Goniothalamus andersonii* 1972 isoliert, in seiner Struktur aufgeklärt und die Akkumulation für zwei weitere Arten, *Goniothalamus macrophyllus* und *Goniothalamus malayanus*, bestätigt (JEWERS 1972). Weitere Isolierungsarbeiten mit Blatt- und Sprossextrakten aus *Goniothalamus sesquipedalis* wurden 1984 von TALAPATRA *et al.* durchgeführt (TALAPATRA *et al.* 1985A). Neu beschrieben werden konnten Goniodiol (**13**), Goniodiol-7-monoacetat (**56**), Goniodiol-diacetat (**16**) und Goniotriol (**15**).

Von der Struktur des Goniothalamin (**14**) sind auch deren Oxide bekannt, Goniothalaminoxid (**57**) aus *Goniothalamus macrophyllus* (SAM *et al.* 1987) und 5-Acetoxy-isogoniothalaminoxid (**58**) (HASAN 1994).

Goniotriol-8-monoacetat (**59**) und Goniodiol-8-monoacetat (**60**) konnten aus *Goniothalamus giganteus* als weiter sich in Bioassays aktiv erweisende Substanzen 1990 bzw. 1992 isoliert werden (FANG 1990, WU 1992).

5-Acetylgoniothalamin (**61**) als weiteres Derivat wurde aus *Goniothalamus uvaroides* 1991 beschrieben (AHMAD *et al.* 1991). Als letztes aus der Gruppe der 7,8 dioxxygenierten Styrylpyrone wurde Etharvendiol (**62**) aus *G. arvensis* beschrieben (BERMEJO 1998). Aus dieser Arbeitsgruppe stammte auch die Aufklärung des gesättigten Styrylpyrones Garvensintriol (**63**).

Zingiberaceae

Aus *Alpinia speciosa*, einer *Zingiberaceae*, wurden 1966 von KIMURA *et al.* (KIMURA 1966) Kawainderivate isoliert: Desmethoxyyangonin (**3**) und 7,8-Dihydrodesmethoxy-Yangonin, das als Dihydro-5,6-dehydrokawain (**43**) aus *Piper methysticum* bekannt ist.

Fabaceae

Auch in Leguminosen konnten das Vorkommen von Styrylpyronen nachgewiesen werden: Für *Mundulea sericea* wurde ein Derivat (**64**) des Methoxyyangonin mit einer 1,1 Dimethyl-2-propenyl-Seitenkette beschrieben (MANGER 1967). Bei phytochemischen Arbeiten mit Wurzelextrakten von *Acosmium subelegans* ist 4-Methoxy-6(-*p*-hydroxystyryl) α -pyron (**65**) isoliert worden (PAULINO FILHO *et al.* 1977).

Gesneriaceae

Aus *Didymocarpus aurentiaca* wurden 5,6-Dehydrokawain (**66**) als auch 7,8-Epoxy-5,6-dehydrokawain (**17**) beschrieben (ADITYACHAUDHURY *et al.* 1976A, ADITYACHAUDHURY *et al.* 1976B).

Asteraceae

Das erste Styrylpyron in Asteraceae wurde von TALAPATRA 1976 beschrieben, es handelt sich um 4'-Hydroxydehydrokawain (**65**) (TALAPATRA *et al.* 1976).

Polygalaceae

Von verschiedenen Arten dieser Familie werden lokal Heilmittel gewonnen. Bekannt ist die nordamerikanische Klapperschlangenwurzel *Polygala senega*. Aus einer anderen Art dieser Gattung wurden nun auch Styrylpyrone isoliert und strukturaufgeklärt. Es handelt sich um die Dihydrostyrylpyrone Dihydromethysticin (**12**), 4-Methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-14-methoxydihydrostyryl)-2-Pyron (**67**), 4-Methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-10,14-dimethoxydihydrostyryl)-2-Pyron (**68**) und die Styrylpyrone Methoxyyangonin (**2**), 5'-Methoxy-5,6-dehydromethysticin (**46**), 4-Methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-14-methoxystyryl)-2-Pyron (**69**) (PIZZOLATTI 2000).

Einleitung

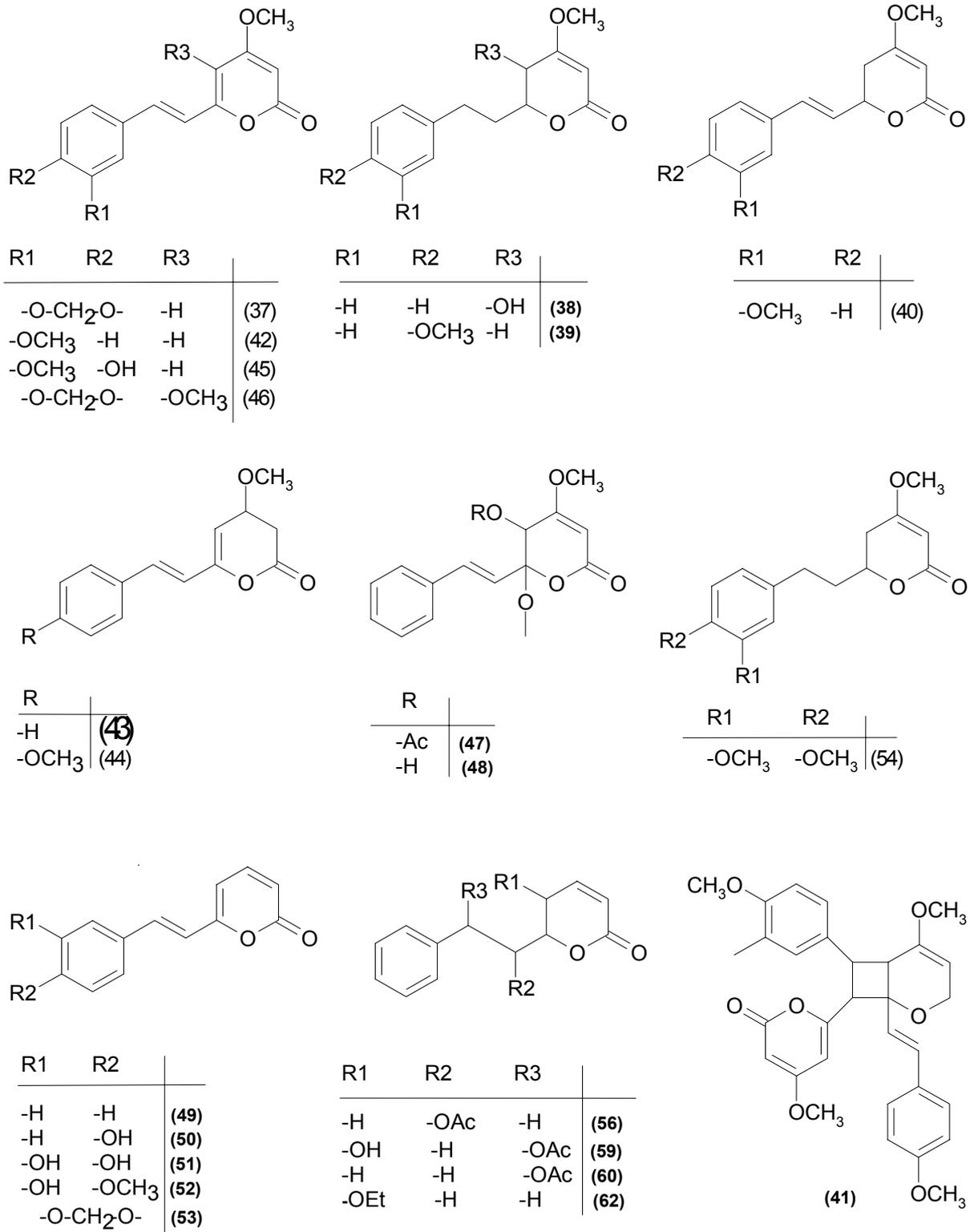
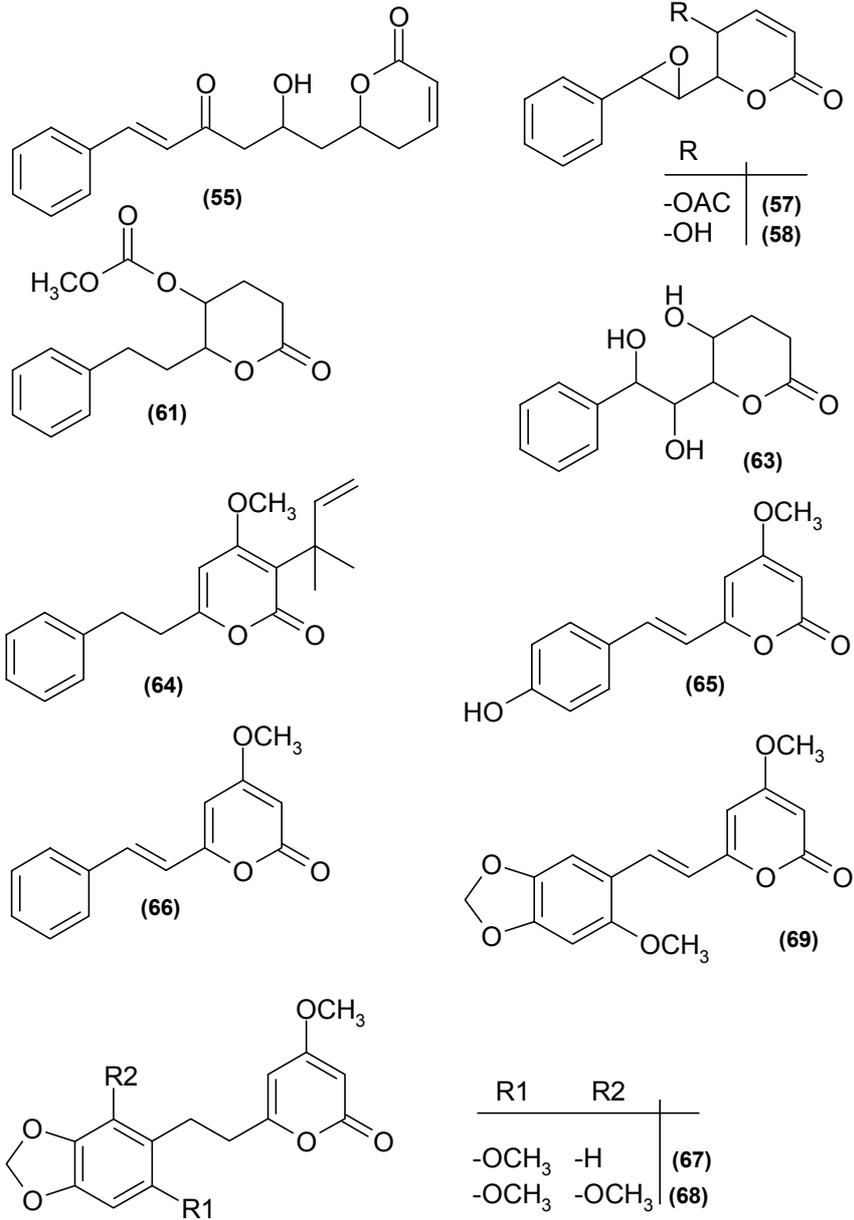


Abbildung 1.3-6. Strukturformeln von den im Text erwähnten Styrylpyronen.



Fortsetzung Abbildung 1.3-6: Strukturformeln von den im Text erwähnten Styrylpyronen.

1.3.3 Biosynthese

Die überwiegende Mehrzahl pflanzlicher Phenole leitet sich von Metaboliten ab, die durch den Shikimatweg gebildet werden (DEWICK 1985, 1988, 1989, 1994, VEIT und GIMBINGER 1993). Die beiden Endprodukte können dann in vielfältiger Weise modifiziert werden. Dazu gehört auch die Biosynthese von Styrylpyronen neben der Synthese von Hydroxyzimtsäureestern, Arylpyronen, Benzalacetonen, Stilbenen und Flavonoiden (Abbildung 1.3-8). Charakteristische Eigenschaften der verschiedenen Polyketidsynthesen sind in Tabelle 1.3-2 aufgeführt. Soweit bekannt sind hier unter anderem jeweils Informationen zu Temperaturverhalten, pH-Wert Abhängigkeiten sowie kinetischen Daten und das Molekulargewicht angegeben.

Biosynthese von Styrylpyronen in Pilzen

Alle Untersuchungen zur Biosynthese von Styrylpyronen wurden bisher an Pilzen durchgeführt. Eine Übersicht zu diesen Arbeiten geben Arbeiten von GILL und STEGLICH (GILL und STEGLICH 1987). Nach derzeitigem Kenntnisstand leitet sich der Styrylteil dieser Moleküle von Phenylalanin über *p*-Cumarsäure und Kaffeoyle-CoA ab. TOWERS und SUBBARAO haben in einem Übersichtsartikel die bisherigen Untersuchungen zum Metabolismus aromatischer Aminosäuren in Basidiomyceten zusammengefasst (TOWERS 1972). PAL (Phenylalaninammoniumlyase) sowie TAL (Tyrosinammoniumlyase)-Aktivität konnte in vielen Basidiomyceten nachgewiesen werden (BANDONI 1968, POWER *et al.* 1965, TOWERS 1969). Es werden unterschiedliche Zimtsäurederivaten akkumuliert. Diese fungieren als Startermoleküle in der Styrylpyronbiosynthese, weiterhin werden sie als monomere Bestandteile der Sporophoren-Polymere angesehen (GILL und STEGLICH 1987). Inkubationsversuche mit verschiedenen, radioaktiv markierten aromatischen Säuren an *Polyporus hispidus* ergaben folgende Ergebnisse: Phenylalanin-3-¹⁴C und Tyrosin-3-¹⁴C werden in 11 bzw. 14 Tagen zu *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, *p*-Hydroxybenzoesäure und *p*-Hydroxyphenylelessigsäure umgesetzt. Bei einer Inkubationszeit von 20 Tagen nimmt der relative Anteil gebildeter Kaffeesäure zu. Zimtsäure wird ebenfalls weiter zu *p*-Cumarsäure und Kaffeesäure metabolisiert (PERRIN und TOWERS 1973A). HATFIELD und BRADY konnten die Biosynthese des Hispidins in Kulturen von *Polyporus schweinitzii* aufklären: aus einer C₉- und zwei C₂-Einheiten wird Hispidin aufgebaut. Dabei haben sie ¹⁴C markiertes Acetat und L-Phenylalanin-U-¹⁴C als Substrate dem Kulturmedium zugefügt (HATFIELD und BRADY 1973). Nach einer Inkubationszeit von 20 Tagen konnte Hispidin isoliert werden, allerdings musste es wegen Stabilitätsproblemen vor Messung der spezifischen Aktivität in Trimethylhispidin überführt werden. Weitergehende Experimente zur Biosynthese des Hispidins in Pilzen wurden vor allem von PERRIN und TOWERS (PERRIN und TOWERS 1973B), HATFIELD (HATFIELD 1970) und PERRIN (PERRIN 1972) durchgeführt. Durch Inkubationsversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen, anschließender Isolierung von Hispidin und Messung der spezifischen Aktivität von Trimethylhispidin und Veratrumsäure, die nach Oxidation von Trimethylhispidin entstanden war, konnte der Einbau von folgenden Substanzen bewiesen werden: Phenylalanin-2-¹⁴C, Phenylalanin-3-¹⁴C, Tyrosin-3-¹⁴C, Zimtsäure-3-¹⁴C, *p*-Cumarsäure-3-¹⁴C, Kaffeesäure-3-¹⁴C, Natriumacetat-2-¹⁴C und

Einleitung

Malonsäure-2-¹⁴C. Dabei wurden *p*-Cumarsäure-3-¹⁴C und Kaffeesäure-3-¹⁴C von allen getesteten Vorstufen am effizientesten in die Moleküle eingebaut. Obwohl Bisnoryangonin nur in sehr kleinen Mengen detektiert werden konnte, ist eine enzymatische Umsetzung zu Hispidin nachweisbar. Dieses Ergebnis bestätigt auch eine frühere Arbeit, in der die enzymatische Hydroxylierung von *p*-Cumarsäure und Bisnoryangonin in Pilzen festgestellt wurde (PERRIN und TOWERS 1973A). Diese Hydroxylierung scheint durch das gleiche Protein zu erfolgen, wie Untersuchungen mit gereinigter *p*-Cumarsäurehydroxylase ergaben (NAMBUDIRI *et al.* 1974). Diese Erkenntnisse sind in Abbildung 1.3-7 zusammengefasst.

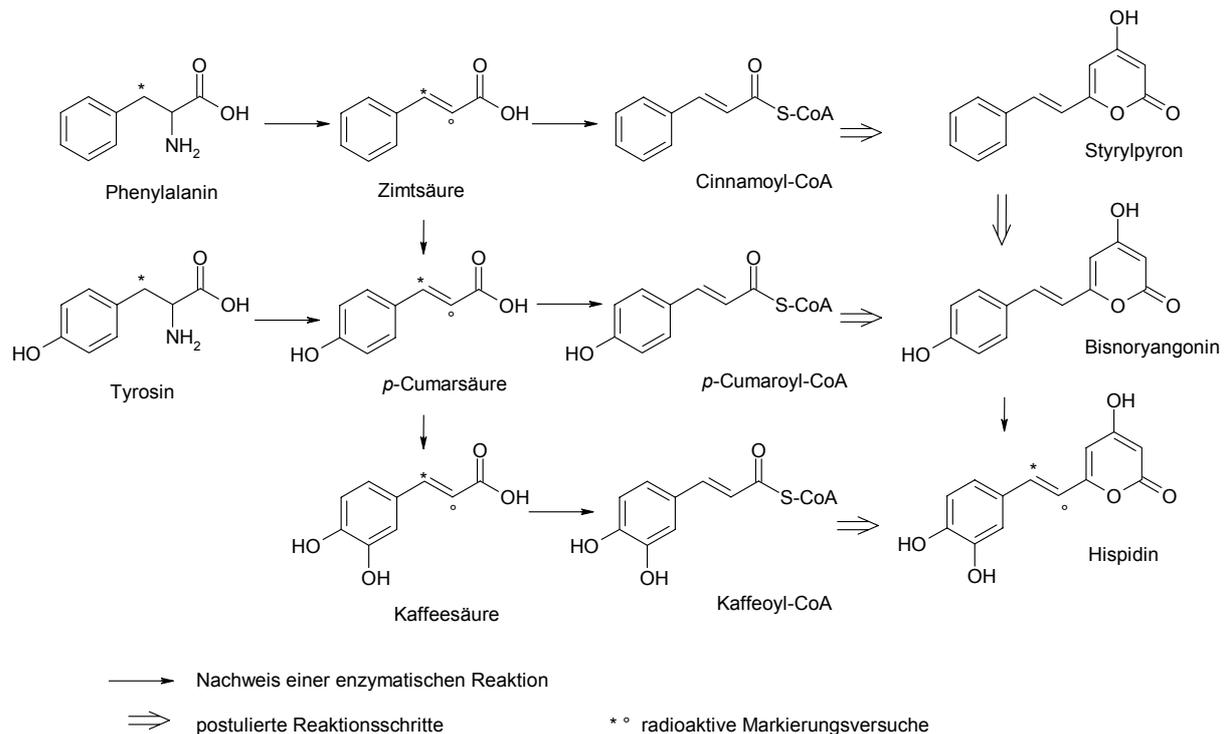


Abbildung 1.3-7: Nachgewiesene und postulierte Schritte der Biosynthese von Styrylpyronen in Pilzen.

Ähnlich der Flavonoidbiosynthese in höheren Pflanzen, z.B. bei Versuchen mit Petersilienzellkulturen, (HAHLBROCK *et al.* 1971, HAHLBROCK 1972), zeigt auch in Pilzen die Hispidinbiosynthese eine Lichtabhängigkeit (NAMBUDIRI *et al.* 1973, TOWERS *et al.* 1974, VANCE *et al.* 1974). In im Dunkeln wachsenden Zellkulturen konnte weder eine Hispidinproduktion noch eine *p*-Cumarsäure-Hydroxylase Aktivität gemessen werden. *P*-Cumarsäurehydroxylase Aktivität und Hispidinproduktion setzten 10 Tage nach Belichtung der Kulturen ein. Ein Maximum der *p*-Cumarsäure-Hydroxylase Aktivität wurde nach 12 Tagen gemessen, die maximal gebildete Hispidinmenge war nach 16 Tagen Bestrahlung mit Licht erreicht. Während für die PAL ein Aktivitätsmaximum in hell gehaltenen Kulturen gemessen wurde, liegt das Aktivitätsmaximum für TAL und auch für Transaminasen in den im Dunkeln gewachsenen Kulturen höher. Für die CoA-Ligase ist eine Aktivität für beide Wachstumsarten gemessen worden.

Styrylpyrone als Nebenprodukte in Chalconsynthase-Enzymtest

Untersuchungen zur Biosynthese von Styrylpyronen in höheren Pflanzen liegen bisher noch nicht vor. Bei enzymatischen Untersuchungen an Zellkulturen von *Petroselinum hortense* zeigte sich allerdings eine an die Chalconsynthase (CHS) gekoppelte Bisnoryangoninbildung (HRAZINDA *et al.* 1976, KREUZALER und HAHLBROCK 1973, KREUZALER und HAHLBROCK 1975A, B). Bisnoryangonin kann in *Petroselinum hortense in-vivo* nicht nachgewiesen werden und wird deswegen als Artefakt bei der enzymatischen Umsetzung von *p*-Cumaroyl-CoA mit Malonyl-CoA Einheiten angesehen. Bei Zusatz von Reagenzien mit freier Thiol-Gruppe wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol konnte im Enzymassay eine gesteigerte Bisnoryangoninproduktion gemessen werden. Werden Kaffeoyl-CoA oder Feruoyl-CoA als Substrate eingesetzt, konnten ebenfalls die entsprechenden Styrylpyrone im Enzymtest nachgewiesen werden (KREUZALER und HAHLBROCK 1975C). 4-Hydroxy-2-Pyrone sind ebenfalls als Nebenprodukte bei Reaktionen der CHS oder Stilbensynthase (STS) mit nichtphysiologischen Substraten bekannt (ZUURBIER 1998).

1.3.4 Stellung im Phenylpropanstoffwechsel

Aus biosynthetischen Kondensationsreaktionen von Zimtsäurederivaten mit Acetyl-CoA bzw. Malonyl-CoA Molekülen können verschiedene Substanzklassen resultieren (siehe Abbildung 1.3-8); z. B. Flavonoide, Stilbene und auch Styrylpyrone, von denen die Biosynthese der Flavonoide wegen ihrer ubiquitären Verbreitung am besten untersucht ist (HELLER und FORKMANN 1993). Als Schlüsselenzym gilt die Chalconsynthase (CHS), die die Verknüpfung von *p*-Cumaroyl-CoA mit drei Malonyl-CoA Molekülen katalysiert (HELLER und FORKMANN 1993). Neben *p*-Cumaroyl-CoA, das physiologische Hauptsubstrat für die CHS, wurden in einigen Pflanzen auch Chalconsynthasen gefunden, die auch Kaffeoyl-CoA und Feruoyl-CoA akzeptieren (HELLER und FORKMANN 1988, PETERS *et al.* 1988, STICH und FORKMANN 1988, WELLE und GRISEBACH 1987). Der erste Nachweis der CHS-Aktivität gelang KREUZALER & HAHLBROCK (KREUZALER und HAHLBROCK 1972) mit Hilfe von Petersilien-

Zellkulturen. Nach grundlegender biochemischer Charakterisierung (EBEL und HALBROCK 1982, HALBROCK und SCHRÖDER 1975, HELLER und FORKMANN 1988) wurde in der letzten Zeit die Expression und Regulation der CHS als Antwort auf Pflanzen- und Blütenentwicklung sowie auf UV-Strahlung, Pathogenangriff und andere Umwelteinflüsse auf molekularbiologischer Ebene weitgehend untersucht (DANGL 1992, FORKMANN 1993, VAN DER MEER *et al.* 1992). Nach Reinigung der CHS aus verschiedenen Pflanzen (BEERHUES und WIERMANN 1988, KNOGGE *et al.* 1986, PETERS *et al.* 1988, WELLE und GRISEBACH 1987) konnten Antikörper gegen CHS aus *Glycine*, *Secale* und zwei CHS-Formen aus Spinat gefunden werden sowie das Molekulargewicht der CHS als Homodimer mit zwei Untereinheiten von 40-45 kDa bestimmt werden (SCHRÖDER 1997). CHS-Aktivität konnte in Blüten (HRAZDINA und WEEDEN 1986), Keimlingen (BRÖDENFELDT und MOHR 1986), und Wurzeln (ROMMESWINKEL 1992) nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Lokalisation ist noch unklar. BEERHUES *et al.* (BEERHUES *et al.* 1988) konnten mittels Immunofluoreszenz- und Immunogoldtechniken nachweisen, dass das CHS Protein nicht an den Tonoplasten und an das Endoplasmatische Retikulum gebunden ist, was mit der leichten Extrahierbarkeit des Enzyms gut in Einklang zu bringen ist, während HRAZDINA *et al.* (HRAZDINA *et al.* 1987) eine Lokalisation der CHS an das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) vorschlugen. Dies würde bedeuten, dass die Biosynthese von Flavonoiden von ganz oder teilweise membranassoziierten Enzym-Komplexen katalysiert wird (HRAZDINA und WAGNER 1985, HRAZDINA *et al.* 1987, HRAZDINA *et al.* 1988, HRAZDINA 1992). ROMMESWINKEL *et al.* konnten 1992 zeigen, dass in Wurzelzellen von *Pisum* die CHS scheinbar, zumindest teilweise, mit subzellulären Strukturen assoziiert ist (ROMMESWINKEL 1992). Ebenso wurde eine gemeinsame Lokalisation der CHS und der Chalkonisomerase (CHI) an ER und Tonoplasten in Wurzelspitzenzellen von *Arabidopsis* festgestellt und das Vorhandensein von Proteinen postuliert, die die „löslichen“ Flavonoidenzyme zu den Membranen organisieren (SASLOWSKY 2001).

Durch die Aufklärung der dreidimensionalen Kristallstruktur der CHS aus Alfa Alfa (*Medicago sativa*) ist nun nachgewiesen, dass das Enzym zwei funktionell unabhängige aktive Zentren besitzt; die Hydroxyzimtsäureester-Bindungsstelle und eine durch 4 Aminosäurereste definierte Stelle, bei der die Cyclisierung stattfindet. Es handelt sich um Cys 164, Phe 215, His 303 und Asn 336. Diese Sequenz wird bei allen der CHS verwandten Enzymen als hochkonserviert angenommen (FERRER 1999, JEZ 2000B). Der Vergleich von geklonten DNA-Sequenzen (SCHRÖDER und SCHRÖDER 1990) und der Reaktionsmechanismen zeigen eine enge Verwandtschaft der Chalconsynthase mit der Stilbensynthase auf. 70 % der Aminosäuresequenzen sind identisch und das an der Kondensationsreaktion beteiligte Cystein im aktiven Zentrum ist bei beiden Proteinen an der selben Stelle lokalisiert, während eine unterschiedliche Faltung des Enzym-Intermediat-Komplexes vor dem Schließen des neuen aromatischen Ringes für die Bildung der unterschiedlichen Produkte verantwortlich ist (LANZ *et al.* 1991A, LANZ *et al.* 1991B, PREISIG-MUELLER *et al.* 1995, TROPF *et al.* 1995). Nachdem HILLIS & HASEJAVA (HILLIS 1962) und IBRAHIM *et al.* (IBRAHIM 1962) nach Fütterungsversuchen mit radioaktiv markiertem Phenylalanin und Essigsäure auch bei Stilbenen die Kombination von Shikimisäureweg und Polyacetatweg nachwies, konnte

BILEK (BILLEK 1964) und endgültig RUPPRICH *et al.* 1978 und 1980 (RUPPRICH und KINDL 1978, RUPPRICH *et al.* 1980) Resveratrol aus *p*-Cumaroyl-CoA und drei Malonyl-CoA-Einheiten darstellen.

Anstatt *p*-Cumaroyl-CoA kann auch Zimtsäure-CoA als Vorstufen von Stilbenen dienen (SCHÖPPNER und KINDL 1979). Der Vergleich von klonierten DNA-Sequenzen und Reaktionsmechanismen spricht für eine enge Verwandtschaft von Chalconsynthase und Stilbensynthase, wobei im Verlauf der Evolution die Stilbensynthase offenbar mehrfach aus der CHS durch einen begrenzten Austausch von Aminosäuren entstanden ist (SCHRÖDER und SCHRÖDER 1990, TROPF *et al.* 1994, TROPF *et al.* 1995).

Die Kondensation von Zimtsäure mit einer Acetat-Einheit führt zu den Arylpyronen. Für Psilotin, einem Vertreter dieser Sekundärstoffklasse, ist dieser Biosyntheseweg nachgewiesen. (LEETE *et al.* 1982, TOWERS und WAT 1979). Dieses Arylpyron konnte in zwei Arten innerhalb der Pteridophyta, *Tmesipteris tannensis* (TAKAHASHI 1990, TSE 1967) und *Psilotum nodum*, Psilotaceae (BALZA *et al.* 1985, MC INNES *et al.* 1965) nachgewiesen werden. Ähnlich dem Equisetumpyron aus *Equisetum* kann auch dieses Pyron in glucosidierter Form vorliegen.

Zur Familie der pflanzenspezifischen Polyketidsynthasen werden aktuell neben der Chalconsynthase (CHS), Stilbensynthase (STS) und der Acridonsynthase (ACS), die Benzophenonsynthase (BPS), Valerophenonsynthase (VPS), Benzalacetonsynthase (BAS), 2-Pyrone synthase (2PS) und die Arylpyrone synthase (APS) gerechnet. Diese Annahmen müssen aber zum Teil noch durch endgültige Sequenzanalysen und Strukturaufklärungen bestätigt werden (JEZ 2000A, KUROSAKI 1999, MORITA 2001, SCHRÖDER 1997, 1999).

Einleitung

Tabelle 1.3-2: Charakteristische Eigenschaften verschiedener Polyketidsynthasen.;
 CHS = Chalconsynthase mit zwei unterschiedlichen Aktivitäten AI und AII;
 STS = Stilbensynthase; 6HMS = 6-Hydroxy-Melleinsynthase; 2PS = 2 Pyronsynthase,
 BPS = Benzophenonsynthase; ACS = Acridonsynthase; BAS = Benzalacetonsynthase;
 K-CoA = Kaffeoyl-CoA; C-CoA = *p*-Cumaroyl-CoA; M-CoA = N-Methylantranioyl-CoA;
 A-CoA = Acetyl-CoA; Ci-CoA = Cinnamoyl-Co; AP-CoA = Phenylpropioyl-CoA;
 H-CoA = Hydroxybenzoyl-CoA; UE= Untereinheit.

Enzym	Spezies	Molekulargewicht	Michaelis Konstanten für die CoA-Ester	Michaelis Konstante für Malonyl-CoA
CHS	<i>Spinacia oleracea</i>	AI: 88 kDa, AII 78 kDa Homodimer mit 45 kDa UE	0,8 µM für C-CoA; AI 1,0 µM für C-CoA; AII	2,0 µM; AI 1,9 µM; AII
	<i>Glycine max</i>	75 ±5 kDa Homodimer	-	-
	<i>Petroselinum hortense</i>	77 kDa Homodimer, mit 40-42 kDa UE	-	-
	<i>Medicago sativa</i>	-	6,1± 1 µM für C-CoA	8,4 µM
STS	<i>Pinus sylvestris</i>	95 kDa Homodimer mit 43 kDa UE	1 µM für Ci-CoA 5 µM für P-CoA	
	<i>Arachis hypogaea</i>	90 kDa Homodimer mit 45 kDa UE	2 µM für C-CoA	10 µM
	<i>Rheum rhaponticum</i>		2 µM für C-CoA	370 µM
6HMS	<i>Daucus carota</i>	Homodimer 285 kDa	-	-
BPS	<i>Centaurium erythraea</i> <i>C. littorale</i>	-	-	-
ACS	<i>Ruta graveolens</i>	69 ±1 kDa Homodimer 40 ±1 kDa UE	10,64 µM M-CoA	32,8 µM
		81 ±4 kDa Homodimer	6,2 µM M-CoA	13 µM
BAS	<i>Rubus idaeus</i>	83 ± 5 kDa Homodimer, 41,5 ± 1,5 kDa UE	3 µM für C-CoA	1 µM
2PS	<i>Gerbera hybrida</i>	Homodimer	3,2 µM für A-CoA	-

Einleitung

Fortsetzung Tabelle 1.3-2: Charakteristische Eigenschaften verschiedener Polyketidsynthasen.
 CHS = Chalconsynthase mit zwei unterschiedlichen Aktivitäten AI und AII;
 STS = Stilbensynthase; 6HMS = 6-Hydroxy-Melleinsynthase; 2PS = 2 Pyronsynthase,
 BPS = Benzophenonsynthase; ACS = Acridonsynthase; BAS = Benzalacetonsynthase;
 K-CoA = Kaffeoyl-CoA; C-CoA = *p*-Cumaroyl-CoA; M-CoA = N-Methylantranioyl-CoA;
 A-CoA = Acetyl-CoA; Ci-CoA = Cinnamoyl-Co; AP-CoA = Phenylpropioyl-CoA;
 H-CoA = Hydroxybenzoyl-CoA; UE= Untereinheit.

Enzym	pH	Temperatur	Katalytisches Zentrum / AS-Sequenz-homologien	Literatur
CHS	7,5-8,0 6,8	- für C-CoA - für K-CoA	-	(BEERHUES und WIERMANN 1985, BEERHUES <i>et al.</i> 1988)
	7,5 ~6,0	- für C-CoA 45 °C für K-CoA	-	(WELLE und GRISEBACH 1987)
	-	30 °C	-	(KREUZALER und HAHLBROCK 1975A, KREUZALER <i>et al.</i> 1979)
	-	-	Cys 164, His 303, Asn 336	(Jez 2000a, c)
STS	-	-	~73 % mit CHS	(FLIEGMANN <i>et al.</i> 1992, GEHLERT <i>et al.</i> 1990, SCHANZ <i>et al.</i> 1992)
	7,5-8,5	- für C-CoA	-	(SCHÖPPNER und KINDL 1984)
	7,5-8,0 6,5	- für C-CoA - für K-CoA	-	(RUPPRICH <i>et al.</i> 1980)
6 HMS	-	-	-	(Kurosaki 1995, 1996)
BPS	7,5	40-45° C	-	(BEERHUES 1996, SCHMIDT 1997)
ACS	7,5	38° C	76% mit CHS	(BAUMERT <i>et al.</i> 1992, BAUMERT <i>et al.</i> 1994, JUNGHANNS <i>et al.</i> 1995)
	7,5	32/40 °C	70-75% mit CHS	
BAS	8,0	-	-	(BOREJSZA-WYSOCKI und HRAZDINA 1996)
2PS	-	-	Cys 169, His 308, Asn 341 74 % mit CHS	(ECKERMANN 1998, HELARIUTTA <i>et al.</i> 1996, JEZ 2000A)

VPS (Valerophenonsynthase): Daten bisher unveröffentlicht

Einleitung

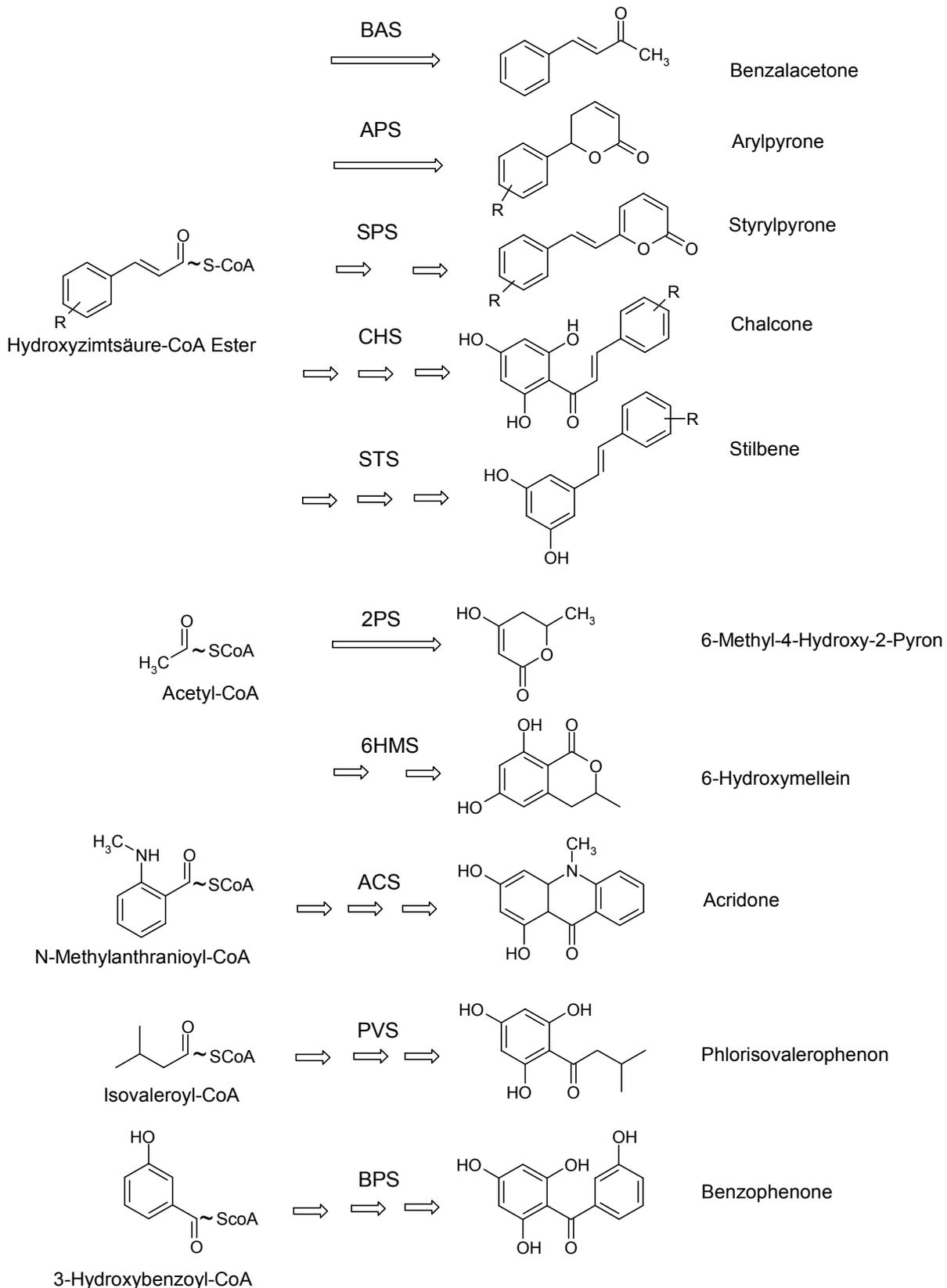


Abbildung 1.3-8: Pflanzenspezifische Polyketidsynthese Reaktionen.

BAS: Benzalacetonsynthase; APS: Arylpyronsynthase; SPS: Styrylpyronsynthase CHS Chalconsynthase; STS Stilbensynthase; 2PS: 2-Pyronsynthase; 6HMS: 6-Hydroxymelleinsynthase; ACS: Acridonsynthase; VPS: Valerophenonsynthase; BPS: Benzophenonsynthase. Die Anzahl der

Pfeile entspricht der Anzahl der jeweils mit dem Startermolekül verknüpften Malonyl-CoA Molekülen.

1.3.5 Pharmakologie und biologische Aktivität

Die beschriebenen Anwendungen von styrylpyronhaltigen Pflanzen in der traditionellen Medizin sind zahlreich. Allein für die Anwendung des Kava-Kava Wurzelstocks (*Piper methysticum* G. FORST) aus der Inselwelt des pazifischen Raumes sind neben der Verknüpfung mit dem sozialen, politischen und religiösen Leben bis zu 20 Anwendungen beschrieben. Heilende Wirkungen bei Asthma, Bronchitis, Migräne und die Linderung von Zahnfleischentzündungen und Insektenstichen zählen hierzu (WIEDER 1998).

Goniothalamus-Arten besitzen beträchtliche ethnobotanische und -medizinische Bedeutung, wobei die Anwendung auf den Gehalt von Styrylpyron-Derivaten zurückgeführt wird (BURKHILL 1935, JEWERS 1972, QUISUMBING 1978, TALAPATRA *et al.* 1985B). Die Verbrennung der Baumrinde dient zur Abwehr von Insekten, speziell von Moskitos (GOH *et al.* 1995). Getrocknet und pulverisiert werden die Blätter von *Goniothalamus sesquipedalis* WALL. auch als Schmerzmittel verwandt (TALAPATRA *et al.* 1985A). In neueren Arbeiten wurden cytotoxische Wirkungen gegen verschiedene menschliche Tumorzellen nachgewiesen (ALKOFAHI *et al.* 1989, WU *et al.* 1992).

Für die Phytotherapie wurden bisher Präparate von Kava-Kava gegen nervöse Angst-, Spannungs- und Unruhezustände entwickelt. In der Homöopathie liegen die Anwendungsgebiete in der Therapie von Erregungs- und Erschöpfungszuständen, Magenübersäuerung und Harnröhrenschmerz.

Das derzeitige Forschungsinteresse an dieser Substanzgruppe stützt sich auf weitere tierexperimentell bestätigte Eigenschaften wie Cytotoxizität, antitumorale Aktivität, Schädlingsbekämpfung, Teratogenität und Embryotoxizität (ALI 1997, SAM *et al.* 1987, TALAPATRA *et al.* 1985A, WU *et al.* 1991).

Speziell für Kava-Kava sind lokalanästhetische, antikonvulsive, antifibrillatorische, neuroprotektive, spasmolytische Effekte im Forschungsinteresse sowie der Schutz gegen Strychninkampf, tranquilizerartige Wirkungen und die Hemmung auf bedingte Reflexe. (HÄNSEL 1996). Zudem rückt auch hier Kava-Kava als Krebsbekämpfungsmittel immer mehr in den Vordergrund (STEINER 2000).

Eine Verwendung styrylpyronhaltiger Pilze in der traditionellen Medizin ist nicht bekannt. Bei Screening Tests zur Immunmodulation zeigen sowohl Hispidin (**5**) als auch Hispolon, ein Kaffeesäurederivat, Inhibitionen der 5-Lipoxygenase als auch einen Einfluss im Arachidonsäuremetabolismus (ALI 1996A, ALI 1996B). Ebenso ist die antimikrobielle Wirkung von Hispidin (**5**) und Bisnoryangonin (**4**) seit 1972 bekannt (BENEDICT und BRADY 1972). Psilotin, ein Arylpyron, das analog den Styrylpyronen synthetisiert wird, zeichnet sich durch eine keim- und wachstumshemmende Wirkung aus (SIEGEL 1976).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Chemikalien

Aceton	C.I.d.U.	Glycin	SIGMA G-8898
Acrylamid Rotiphorese Gel3	ROTH, 3029	Glutaraldehydsg.	AK Elektronenmikroskopie d. U.
Agar – Agar	MERCK, 1614	LSC Cocktail Hydroluma	J.T. BAKER 8584
Aktivkohle	MERCK, 2514	HEPES	SIGMA H-6903
Ameisensäure (98 %-100 %)	MERCK, 264	Imidazol	ROTH 3899
Ammoniaklösung (32 %), reinst	MERCK, 5426	Jodacetamid	SIGMA.I-1149
Ammoniumnitrat	MERCK, 1188	Kaffeesäure	ROTH 5869
Ammoniumsulfat	MERCK, 1217	Kaliumdihydrogenphosphat	($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$) MERCK 4873
Ammoniumsulfat	MERCK 1211	Kaliumhydroxyd	MERCK 5033
Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd)	MERCK, 822314	Kaliumjodid	MERCK 5043
Ammoniumpersulfat (APS \geq 98 %)	SIGMA, A-3678	Kaliumnitrat	MERCK 5063
Bicin	SIGMA B-8660	Kobaltchlorid	($\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) MERCK 2539
Borsäure	MERCK 1605	Kupfersulfat	($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) MERCK 2788
Bromphenolblau	SIGMA, B-8026	Magnesiumsulfat	($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) MERCK 5886
Calciumchlorit ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	MERCK 2382	Malonyl-CoA	SIGMA M-4263
Chloroform	MERCK 2445	Mangansulfat	($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) MERCK 5963
Citrat	SIGMA, C-1909	β -Mercaptoethanol	MERCK, 805740
Coenzym A		MES	SIGMA M5287
(freie Säure)	SIGMA, C-4282,	Methanol (HPLC)	Merck 6007
(Lithium Salz)	SIGMA, C-3019	Methanol	C.I.d.U.
Coomassie Brilliant Blue G 250	FLUKA 27815	<i>myo</i> -Inositol	MERCK 4728
Dicyclohexylcarbodiimid	MERCK 2954	Natriumascorbat	SIGMA A-7631
Diethylether	C.I.d.U.	Natriumcarbonat	MERCK 106398
Dikaliumhydrogenphosphat		Natriumchlorid	MERCK 6400
(K_2HPO_4)	MERCK 4873	Natriumhydrogencarbonat	MERCK 6329
Dioxan:	MERCK 3110	Natriumhydroxidplätzchen pro analysi	MERCK 6482
Dithiothreitol	ALDRICH 150460	Natriumhypochlorit	ROTH 9062.3
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MERCK 802912	Natriummolybdat	($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) MERCK 6521
Dodecylhydrogensulfat,		Natriumthiosulfat-Pentahydrat	MERCK 106516
Natriumsalz	MERCK 822050	Naturstoffreagenz A	(Diphenylborsäure- β -aminoethylester)
Essigsäure (96%)	MERCK 56		ROTH 9920
Ethanol	C.I.d.U.	n-Butanol	MERCK 998
Ethanol Uvasol	MERCK 10980	N-Hydroxysuccinimid	SIGMA H-7377
Ethylacetat	C.I.d.U.	Nikotinsäure	MERCK 6817
EDTA	MERCK 1064		
Entellan	MERCK 107961		
Fe (III)-EDTA-Na	FLUKA 5134		
Formaldehyd (37%) p.a.	MERCK 4003		
Glycerin	SIGMA G-6279		

Material

<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85 %)	MERCK 573	Schwefelsäure (95-98 %)	MERCK 100713
<i>p</i> -Cumarsäure	ROTH 9906	SDS (Lauryl Sulfat)	SIGMA. L-3771
PEG 400 (Polyethylenglycol)	MERCK 807485	Silbernitrat	MERCK 1510
PMSF	SIGMA P-7626	TEMED	ROTH 2367
Polyclar AT (Polyvinylpyrrolidon PVP)	MACHERY NAGEL 815939	Thiamin-HCl	MERCK 8181
Pyridoxol-HCl	MERCK 7527	Trehalose	SIGMA T-5251
Rinderserumalbumin (BSA)	SIGMA A-3294	Trichloressigsäure	MERCK 810
Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid)	MERCK 7631	Trifluoressigsäure	MERCK 808261
Saccharose (Haushaltszucker)	SÜDZUCKER	Liquid Scintillator Quicksafe A	ZINSER Analytik 1008000
Salzsäure (37%)	MERCK 2500	Tris	FLUKA 93349
		UDP-Glucose	SIGMA U-4625
		Ultima Gold (XR)	PACKARD 6013112
		Zinksulfat (ZnSO ₄ x 7 H ₂ O)	MERCK 8883
		Zitronensäure	MERCK 201

Als bidest H₂O wurde Wasser des NANOpuresystem der Firma BARNSTEAD verwendet
Deionisiertes Wasser wurde mit Hilfe einer kommerziellen Mischbett-Ionenaustauscher
Anlage im Institut hergestellt.

Referenzsubstanzen aus der Laborsammlung:

Hispidin	Synthese (ADAM <i>et al.</i> 1994),
Equisetumpyron	KAST, aus <i>Equisetum arvense</i> L. (Gametophyten)
Dikaffeoyl- <i>meso</i> -weinsäure	VEIT, aus <i>Equisetum hyemale</i> L.
Quercetin-3- <i>O</i> -sophorosid	GEIGER, aus <i>Equisetum arvense</i> L.
5'- <i>O</i> -Kaffeoyl-shikimisäure	HELLER, Synthese
Protoapigenein-4'- <i>O</i> -glucosid	GEIGER, aus <i>Equisetum arvense</i> L.
Protogenkwain-4'- <i>O</i> -glucosid	GEIGER, aus <i>Equisetum arvense</i> L.

Enzyme:

β -Glucosidase FLUKA 49290, 5,7 U mg⁻¹, Nr.308813/1

Referenzproteine für die Gelelektrophorese

BIORAD LABORATORIES 161-0315	
Myosin	(220 kD)
β -Galactosidase	(116,5 kD)
Phosphorylase b	(97,5 kD)
Rinderserumalbumin	(66,2 kD)
Eialbumin	(45 kD)

Referenzproteine für die Gelfiltrationschromatographie

PHARMACIA-BIOTECH 17-0442-01 und 17-0441-01	
Chymotrypsinogen A	(25 kD)
Eialbumin	(43 kD)
Rinderserumalbumin	(67 kD)
Aldolase	(158 kD)
Katalase	(232 kD)
Ferritin	(440 kD)

Radiochemikalien

[2-¹⁴C] Malonyl Co-A, 925 kbq, 25 µCi AMERSHAM BUCHLER CFA 570

Chromatographiematerialien

gepackte Säulen

Superose 12 HR 10/30 [®]	PHARMACIA-BIOTECH
Sephacryl S 200 HR HiPrep 16/60 [®]	PHARMACIA-BIOTECH
Alkyl Superose HR 10/10 [®]	PHARMACIA-BIOTECH
HIC Test Kit [®]	PHARMACIA-BIOTECH
Resource HIC Test Kit [®]	PHARMACIA-BIOTECH
NAP [™] -5 Säule Sephadex G-25 [®]	PHARMACIA-BIOTECH
PD-10 Säule Sephadex [™] G-25M [®]	PHARMACIA-BIOTECH
HiTrap Desalting Columns [®]	PHARMACIA-BIOTECH

Leersäulen

C 26/70 [®]	PHARMACIA-BIOTECH
XK 16/20 [®]	PHARMACIA-BIOTECH

HPLC-Säulen

Superspher RP 18 (e) [®] , 4 µm, 120 x 4 mm	MERCK
Nucleosil 120-C-18 [®] (5 µm, 4 x 125 mm) mit Vorsäule Nucleosil 120-C-18 (5 µm, 4 x 11 mm)	MACHERY-NAGEL

Präparative HPLC Säule

Typ SNC, Sperisorb ODS 1 [®] (5 µm, 80 Å) mit Vorsäule	BISCHOFF
--	----------

HPLC-MS Säule

Vertex-Eco-Column [®] , B45 Y76, Batch 5011, Nucleosil 100 C18 [®] , 5 µm, 100 x 2,0 mm ID	KNAUER
---	--------

Material

Säulenfüllmaterialien

Butyl Sepharose 4 FF [®]	PHARMACIA-BIOTECH 17-0980-10
MacroPrep Ceramic [®] Hydroxylapatit Typ II	BIO RAD LABORATORIES 13594IC
Hydroxylapatit	CALBIOCHEM 391948
DEAE Sepharose FF [®]	PHARMACIA-BIOTECH 17-0709-01
Dowex 50 W x 8	FLUKA 44300
Sephadex LH 20 [®] , 25-100µm Korngröße	PHARMACIA-BIOTECH
Polyamid SC6, Korngröße 0,05 - 0,16 mm	MACHERY-NAGEL
Kieselgel ICN Silica 100-200 aktiv 60 Å	ICN 02760 RT
Aluminium (activity grade I, Type WB-2, basic)	MERCK 159029

DC-Platten

DC-Fertigplatten Kieselgel, 60 F254, 5 x 10	MERCK 5719
HPLTC-Fertigplatten, Kieselgel 60F 254 10 x 20	MERCK 5642
Cellulose 0,1 mm (Schichtdicke)	MERCK 5787

Weitere Materialien

Microcon 30, Mikrokonzentratoren	AMICON, 4208
Dialyseschläuche, Typ29/32, Porengröße 25 –50 Å, 12-14 kD	VISKING
Folie, Zellglas, Cellophan	THEIS, Walsrode
Gaze	HARTMANN
Stickstoff (flüssig)	C.I.d.U.
SepPak-C18 Kartuschen(Nr.51910)	WATERS-MILLIPORE
Teflon-Filter Membranen TFM 1,5-10	AURA INDUSTRIES INC
Membranfilter Spartam 30/B; 0,45 µm (Nr. 490407)	CHROMATOGRAPHIE SERVICE
Kämme 0,8 mm und 1,5 mm	OWL-SCIENTIFIC, INC.
Spacer 1,5 mm und 0,8 mm	OWL-SCIENTIFIC, INC.
Acrylharz, LR-white	SIGMA
Faltenfilter, 595 ½ D 125 mm	SCHLEICHER und SCHUELL
Rundfilter	SCHLEICHER und SCHUELL
Gelatinekapseln	Pharmaz. Institut d. U.
Seesand	MERCK 7771

Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial zur Reinigung der Styrylpyronsynthese wurden Gametophyten von *Equisetum arvense* L. in Sterilkultur verwendet. Die keimfähigen Sporen stammten aus Sporophyten, die in Topfbeständen des Botanischen Garten der Universität Würzburg kultiviert wurden. Zur Isolierung der Styrylpyrone wurden Rhizome von *Equisetum arvense* L. als auch *Equisetum hyemale* L., beide aus dem Botanischen Gartens der Universität Würzburg verwendet. Die Rhizome wurden unmittelbar nach der Ernte gewaschen. Sämtliches Pflanzenmaterial für analytische und präparative Arbeiten wurde gefriergetrocknet.

Material

Das Pflanzenmaterial zur Analyse phenolischer Inhaltsstoffe der sporophytischen Gewebe stammte von Pflanzen verschiedener geographischer Herkunftsgebiete, die in Töpfen im Botanischen Garten der Universität Würzburg kultiviert werden.

In Tabelle 2.1-1 sind die in dieser Arbeit untersuchten Taxa aufgelistet. Die Pflanzenproben wurden im Frühjahr bis Herbst des Jahres 1994 geerntet.

Tabelle 2.1-1: Untersuchte Arten und Hybriden. T = Topfkulturen; BG = Botanischer Garten der Universität Würzburg.

Art / Hybride	Herkunftsgebiet / Standort	In Kultur seit (Jahr, Monat)
<i>E. arvense</i> L.	Bochum (T)	89 01
	Finnland (T)	90 06
	„Garten“ aus Gametophytenkultur (T)	(Sporenaussaat 1998) 90 02
	Japan (T)	-
	Arzneipflanzengarten BG „Steppe“; Halbtrockenrasen, BG	-
<i>E. palustre</i> L.	Sinntal, Franken (T)	
	Finnland (T) „Garten“ BG (T)	94 04
<i>E. telmateia</i> EHRH.	Lorch, Baden Württemberg	-
<i>E. fluviatile</i> L.	Skye, Westschottland	91 03
<i>E. pratense</i> EHRH.	Odenwald (T)	89 01
<i>E. sylvaticum</i> L.	Rhön (T)	89 01
<i>E. x font-queri</i> ROTHM.	Skye, Westschottland (T)	91 01
<i>E. x litorale</i> KÜHL ex RUP.	Bochum (T)	90 01
	Skye, Westschottland (T)	91 01
<i>E. x dycei</i> C.N. PAGE	Skye, Westschottland (T)	91 01
<i>E. x rothmaleri</i> C.N. PAGE	Skye, Westschottland (T)	91 01
	Skye, Westschottland (T)	90 01
<i>E. hyemale</i> L.	BG	90 01
<i>E. variegatum</i> SCHLECHT. et WEBER et MOHR		90 01
<i>E. scirpoides</i> MICH.		90 01
<i>E. ramosissimum</i> DESF.		91 01
<i>E. giganteum</i> L.	Tropengewächshaus, BG	91 01

Zur Analyse phenolischer Inhaltsstoffe der gametophytischen Gewebe wurden Prothallien in Sterilkultur angezogen. Fertile Triebe der Schachtelhalme für die Anzucht der Gametophytenkulturen stammten von Pflanzen aus dem Botanischen Garten, Sporophyllstände von *Equisetum telmateia* EHRH. wurden im April 1994 an einem Standort in der Nähe von Lorch/Württ. gesammelt, Sporophyllstände von *Equisetum pratense* EHRH. an einem Standort in der Nähe von Kiel.

Das Pflanzenmaterial für mikroskopische Beobachtungen an Sporophyten stammten aus oben angegebenen Quellen. Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden Rhizome von *Equisetum arvense* L. (Herkunftsgebiet Bochum) und *Equisetum sylvaticum* L. (Herkunftsgebiet Rhön (Topfkulturen) im Dezember 1994 entnommen. Für mikroskopische Untersuchungen der Prothallien standen die Gewebe der Sterilkulturen zur Verfügung.

2.2 Geräte

HPLC Geräte

WATERS Anlage

Pumpen	Typ 510 (WATERS), Typ 501 (WATERS)
Säulenofen	GYNKOTHEK Säulenthermostat
Injektion	20 µL Probenschleife
Steuerung	Gradientensteuerung auf Hochdruckseite durch WATERS Maxima Software
Detektor	Vierkanaldetektor UV / VIS (WATERS M490)
Datenaufnahme und Auswertung	Maximasoftware von WATERS

BECKMAN-Analge

Pumpen	Pumpenmodul 126
Säulenofen	Gynkotheke Säulenthermostat
Injektion	Manuell: 20 µL Probenschleife Autosampler 502, 20µL Probenschleife (BECKMAN)
Steuerung	Gradientensteuerung auf Hochdruckseite (BECKMAN Gold Software in Version 7.0 und 7.11)
Detektor	Photodiodenarraydetektor 168 (BECKMAN)
Datenaufnahme und Auswertung	(BECKMAN Gold Software in Version 7.0 und 7.11)

High-Load System

Kontrolleinheit	Control UnitUV-1, PHARMACIA-BIOTECH
Photometer	Optical Unit UV-1, PHARMACIA-BIOTECH
Pumpe	HI Load Pump P-50, PHARMACIA-BIOTECH
Injektionsventil	Valve IV-7, PHARMACIA-BIOTECH
Fraktionssammler	Gradi Frac™, PHARMACIA-BIOTECH
Leitfähigkeitsmessgerät	Conductivity Monitor, PHARMACIA-BIOTECH
Schreiber	Recorder REC 102, PHARMACIA-BIOTECH

FPLC-Anlage

Kontrolleinheit	LCC-500, PHARMACIA-BIOTECH
Photometer	UV-M II, PHARMACIA-BIOTECH
Pumpen	P-500, PHARMACIA-BIOTECH
Fraktionssammler	Frac-100, PHARMACIA-BIOTECH
Schreiber	REC-481, PHARMACIA-BIOTECH

Material

Weitere Geräte

Autoklav	TECNOMARA, Fedegari, 48 L
Elektrophoreseeinheit	PENGUIN Water-Cooled Dual-Gel Electrophoresis System P9DS-2
Gelappatur	OWL-SCIENTIFIC, INC, joey™ Gel Casting System, Modell # JGC-2
Gefriertrockner	CHRIST Alpha 2-4 mit Analagensteuerung LDC-1M und Drehschiebervakuumpumpe DVO 004 B
Geltrockner	HÖLZEL, Drystar
HPLC-MS/MS	FINNIGAN TSQ 7000 Spektrometer
Inkubationsblock	EPPENDORF Thermostat 5320
Luminescence Fluorimeter LS 50	PERKIN ELMER
Magnetrührer	IKA-Combipac RCO
Methanolbad	HAAKE
Mikroskope	Ortholux II LEITZ Wetzlar ausgestattet für Fluoreszenzmikroskopie mit Ploemopak >(LEITZ) und Mikroskopkamera Orthomat®-W
	LSM-Axiovert-100 Laser-Scanning-Mikroskop, LSM-CARL ZEISS Micro Systems, Software CARL ZEISS LSM, Version 3,58 Beta / 1994 ausgestattet für konventionelle Fluoreszenzmikroskopie mit gekühlter CCD-Kamera (Photometric)
	Bildverarbeitung xv (Version 3.10/ 1994 by John Bradly); Corel draw (Version 5.0 / 1994) Post-Script-Farblaserdrucker CANON 350
pH-Elektrode	WTW pH 350
pH-Meter Digital	KNICK
Radioscanner:	Automatic TLC-Linear Analyzer BERTHOLD LB 28422, Software: Chroma Version 4.14.
Rotationsmikrotom	HM350, MICROM
Rotavapor RE111	BÜCHI
Schlagmühle	CULATTI
Scintilationszähler	WALLACE 1409 BECKMAN LS 1801 BECKMAN LS 3801
Spannungsquelle	CONSORT E835 Electrophoresis power Supply
Stabrührer	HEIDOLF, RZR 2021
Sterilbank	CEAG ENVIRCO
Trockenschrank	MEMMERT
Ultraschallbad	BRANSONIC 221
UV-Lampen (254 und 366 nm)	CAMAG
UV/VIS Spektralphotometer	PERKIN ELMER UVλ2
Vacuumfiltrationsanlage	SUPELCO
Vakuumrotationsverdampfer 461	BÜCHI
Vibrofix VF1 Electronic	JANKE & KUNKEL
Vibrofix	REAMIX 2789

Waagen	METTLER P1210 METTLER P160N METTLER AT200
Wasserbad	GFL 1083
Zentrifugen	Minifuge GL HERAEUS CHRIST SIGMA 2-15 KONTRON, Cerntricon T-1080 SORVALL RC-5B Refrigerated HETTICH, Mikro 12-24

2.3 Sterilkulturen der Equisetum Gametophyten

Anlegen einer Gametophyten-Sterilkultur verändert nach (DUCKETT 1979)

Geschlossene Sporophyllstände wurden jeweils im Frühjahr geerntet, zum Entfetten in 70 % *aq* (V/V) Ethanol geschwenkt und für 5 min in eine 6 % *aq*. (V/V) Natriumhypochloritlösung zur Desinfektion getaucht. Anschließend im Laminar-Flow fünfmal in sterilem Wasser gewaschen und in einer mit Wasser gefüllten Petrischale zerkleinert, dabei treten die Sporen in das Wasser über. Etwa 5 mL Sporenlösung wurden in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit MS-Medium MS 1 überführt. Die Sporen keimten bei Dauerlicht (1500–2000 lx) und bei ca. 20° C nach 4-8 Tagen aus.

Sterilkultur der Equisetum Gametophyten

Je nach Wachstum der Gametophyten wurde die Kultur alle 6-8 Wochen auf ein neues Medium subkultiviert. Das Überimpfen des Pflanzenmaterials wurde unter sterilen Bedingungen an einer Querstrombank durchgeführt. Die Subkultur wurde dabei in etwa mirabellengroße Stücke geteilt und auf neue MS-Medien MS 2 in 300 mL Erlenmeyerkolben überführt. Diese Subkulturen wurden bei Dauerlicht (1500-2000 lx) bei ca. 20° C belassen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die nach 4-6 Wochen geernteten Prothallien in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Zusammensetzung und Herstellung des Nährmediums

Verwendet wurde ein Nährmedium verändert nach (MURASHIGE 1962). Zur Herstellung wurden 10- bzw. 100- fache konzentrierte Stammlösungen angesetzt und bis auf die Glycin-, Nikotin- und Pyridoxol-Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die letztgenannten Lösungen wurden bei 4° C gelagert. Vor ihrer Verwendung wurden die Lösungen auf die in Tabelle 2.3-1 angegebenen Konzentrationen verdünnt. *myo*-Inositol, Saccharose, und Agar-Agar wurden direkt eingewogen. Vor dem Lösen des Agar-Agars wurde der pH-Wert mit 1 M KOH auf pH 5,7-5,8 eingestellt. Das Medium wurde aufgekocht, der Agar-Agar vollständig gelöst, dann in 100-150 mL Portionen auf 300 mL Erlenmeyerkolben verteilt und 20 min bei 121° C (1,1 bar) autoklaviert.

Methoden

Tabelle 2.3-1: Bestandteile des Nährmediums MS nach MURASHIGE (MURASHIGE 1962).

Anorganische Makroelemente	[mg·L ⁻¹]	Anorganische Mikroelemente	[mg·L ⁻¹]
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6,2
KNO ₃	1900	MnSO ₄ x H ₂ O	16,9
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10,59
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25
KH ₂ PO ₄	170	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025
Fe(III)-EDTA-Na	36,7	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025
		KJ	0,83
Vitamine und organische Säuren	[mg·L ⁻¹]	Kohlenhydrate	[g·L ⁻¹]
<i>myo</i> -Inositol	100,0	Saccharose	30,0*
Nikotinsäure	0,5		
Pyridoxol-HCl	0,5		
Thiamin-HCl	1,0		
Glycin	2,0		
		Inerte Zusätze	[g·L ⁻¹]
		Agar-Agar	8,0 # bzw. 9,0*

#: MS-Medium 1 *: MS-Medium 2

2.4 Analyse phenolischer Inhaltsstoffe

2.4.1 Extraktion und Probenaufarbeitung löslicher Phenole

Validierte Methode nach VEIT (VEIT 1990)

Vor der Extraktion wurde das gefriergetrocknete Material mit einer Schlagmessermühle gemahlen. 1 g fein gepulvertes Material wurde mit 10 mL Methanol und 10 mL Lösung des Inneren Standards (Naringenin: 0,80 mg·mL⁻¹) unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen wurde der Extrakt durch Faltenfilter filtriert, und der Pflanzenrückstand zusammen mit dem kleingeschnittenen Filter noch zwei weitere Male mit 25 mL Methanol auf diese Weise extrahiert. Zwischen den Extraktionsgängen wurde das Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer (35° C; 50-150 mbar) eingeeengt und anschließend bis zur Trockene gebracht. Der einrotierte Extrakt konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert werden. Wurde eine im Verhältnis zum Inneren Standard geringe Konzentration der zu bestimmenden Substanzen erwartet, wurden 5 mL Innerer Standardlösung zugegeben. Für die HPLC-Analyse wurde der Rückstand in 2,5 mL Methanol und nach Zugabe von 0,5 mL Wasser gelöst und anschließend membranfiltriert (0,45 µm). Um eine Analysenlösung zu erhalten, die sich vollständig von der HPLC-Säule eluieren lässt, wurde der Extrakt über eine

vorkonditionierte (3 mL Methanol; 3 mL Wasser) SEP-PAK-C-18 Kartusche vorgereinigt. Der Extrakt wurde von der Kartusche mit 3,5 mL 85 % *aq.* (V/V) Methanol eluiert.

Methode im Mikromaßstab

Proben mit wenig Ausgangsmaterial (50-130 mg gefriergetrocknetes Material; Internodien bestimmter Sprossabschnitte mit Gewebeverbräunungen) wurden zusammen mit Seesand fein zermörsert. Nach Zugabe von 5,0 mL Lösung des Inneren Standards ($0,16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde kurz weiter gemörsert und die überstehende Lösung nach Absetzen der Feststoffe in einen Rundkolben pipettiert. Der Rückstand wurde drei weitere Male mit Methanol nachextrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden zur Trockene eingeeengt und anschließend in 1–1,5 mL 50 % *aq.* (V/V) Methanol erneut gelöst und vor der HPLC-Analyse kurz abzentrifugiert.

2.4.2 Präparation und Extraktion zellwandgebundener Phenole

Die Methoden wurden weitgehend von LANGE und STRACK (LANGE *et al.* 1994, STRACK *et al.* 1989, STRACK 1988B) übernommen.

Methanolische Extraktion

Rhizomsprossstücke von etwa 1 g Frischgewicht wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser fein zerrieben, in 7 mL 100 % Methanol und 3 mL Innerer Standardlösung ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) suspendiert und bei 35° C für eine Stunde geschüttelt. Die festen Bestandteile wurden abzentrifugiert und der erhaltenen Rückstand wurde zwei weitere Male mit je 10 mL Methanol nachextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden zur Trockene gebracht (35 °C; Vakuum: 50-150 mbar) und in 3 mL 50 % *aq.* (V/V) Methanol aufgenommen. Vor der HPLC-Analyse wurde die Lösung kurz vorher abzentrifugiert und die klare Lösung injiziert. Um mögliche Unterschiede in Gehalt und Muster der Komponenten festzustellen, wurde die Extraktion mit 80 % *aq.* (V/V) Methanol und mit Methanol-Chloroform-7 M Ameisensäure, 12:5:3, (V/V/V) durchgeführt. Zur Berechnung der löslichen Inhaltsstoffe als prozentuale Konzentration bezogen auf das Trockengewicht wurde der Trocknungsverlust des Gewebes bestimmt.

Präparation gereinigter Zellwände

Das wie im ersten Teil des Abschnitts 1.4.2 beschrieben vorextrahierte Pflanzenmaterial wurde wie in Tabelle 2.4-1 angegeben behandelt.

Tabelle 2.4-1: Präparation gereinigter Zellwände.

Schritt	Lösungsmittel (je 10 mL)		
1	H ₂ O	2 x	jeweils 15 min schütteln,
2	SDS 1 % <i>aq.</i> (w/V)	2 x	anschließend
3	1M NaCl	2 x	5 min bei 7000 x <i>g</i>
4	H ₂ O	2 x	zentrifugieren
5	Methanol	4 x	
6	Aceton	2 x	
7	Diethylether	2 x	

Die Überstände aus 1-4 wurden gefriergetrocknet, die Überstände aus 5-7 im Vakuum eingengt. Diese Rückstände wurden erneut in 3 mL 50 % *aq.* (V/V) Methanol aufgenommen und nach Zentrifugation (5 min, 19000 x *g*) wurde dieser Überstand für eine HPLC-Analyse verwendet. Die gereinigten Zellwände wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

Extraktion zellwandgebundener Stoffe

Die Extraktion und Hydrolyse wurden mit je 200–240 mg Wandmaterial in 6 Reaktionsansätzen jeweils als Doppelprobe wie in Tabelle 2.4-2 aufgelistet durchgeführt.

Tabelle 2.4-2: Reaktionsansätze zur Extraktion zellwandgebundener Stoffe.

Reaktionsansätze:	Methode:	
Saure Hydrolyse	a) 8 mL 1,4-Dioxan HCl (9:1, V/V) 70° C, 8 h rühren b) 8 mL 6 M HCl 100° C, 4 h rühren	Überstand dekantieren, zur Trockene einengen, mit KOH neutralisieren, dekantieren, anschließend Gefriertrocknung
Alkalische Hydrolyse	a) 8 mL 80°C heiße 1 M NaOH, bei RT 20 h rühren b) 8 mL 80°C heiße 0,1 M NaOH bei RT, 20 h rühren	mit 1,5 M Essigsäure neutralisieren dekantieren und anschließend Gefriertrocknung
Dioxan-Extraktion	8 mL 80 % <i>aq.</i> (V/V) 1,4 Dioxan, bei RT, 48 h rühren	dekantieren, im Vakuum zur Trockene einengen
Kontrolle	8 mL Methanol, bei RT 48 h rühren	dekantieren, im Vakuum zur Trockene einengen

2.4.3 HPLC-Analytik

Alle Analysen der Pflanzenextrakte wurden an der HPLC-Anlage der Firma BECKMAN durchgeführt.

Trennbedingungen:

Säule:	Supersphere RP 18 (e), 4 mm, 120 x 4 mm
Vorsäule:	Lichrochart RP 18 - Kartusche 4 x 4 mm temperiert auf 15° C
Fließmittel A:	100 % Methanol
Fließmittel B:	Methanol: <i>ortho</i> -Phosphorsäure (0,15 % <i>aq.</i> (V/V), pH 2,0) 23:77 (V/V)
Durchfluss:	1 mLmin ⁻¹
Probenschleife:	20 µL
Gradient I:	0 min, 100 % B, 3,6 min isokratisch 100 % B, innerhalb 20,4 min linear auf 80,5 % B, 6 min isokratisch 80,5 % B, innerhalb 30 min linear auf 51,9 % B, 6 min isokratisch 51,9 % B, innerhalb 1,2 min auf 0 % B, 6 min isokratisch 0 % B
Gradient II:	0 min, 100 % B, 3,6 min isokratisch 100 % B, innerhalb 20,4 min linear auf 80,5 % B, 6 min isokratisch 80,5 % B, innerhalb 13 min linear auf 68,1 % B, innerhalb 0,8 min auf 0 % B, 7 min isokratisch 0 % B
Gradient III:	0 min, 100 % B, 3,6 min isokratisch 100 % B, innerhalb 20,4 min linear auf 80,5 % B, 6 min isokratisch 80,5 % B, innerhalb 40 min linear auf 42,4 % B, innerhalb 1,2 min auf 0 % B, 6 min isokratisch 0 % B
Equilibrierphase:	25 min isokratisch 100 % B
Detektion:	UV ₃₃₀ und UV ₃₇₀ ; DAD 200-400 nm

Für die Analyse von Rhizomextrakten wurde ein verkürzter Gradient (Gradient II) entwickelt, für Proben mit spät eluierenden Verbindungen wurde zur besseren Trennung der leicht veränderte Gradient III programmiert. Alle anderen Proben, soweit nicht anders vermerkt, wurden mit Gradient I analysiert.

Qualitative Auswertung – Peakidentität und Peakzuordnung

Die Peakzuordnung im Chromatogramm erfolgte durch Vergleich der *on-line* UV-Spektren und der absoluten und relativen Retentionszeiten mit Peaks von Referenzchromatogrammen. Die relativen Retentionszeiten wurden durch Bezug auf die Retentionszeiten des Inneren Standards berechnet. Bei problematischer Zuordnung wurde

die Identifizierung über Cochromatographie bestätigt. Der Vergleich von UV-Spektren, die in allen Peakmaxima und -Wendepunkten aufgezeichnet wurde, erlaubte die Beurteilung der Peakreinheit. Weichen diese Spektren voneinander ab, wurde keine reine Substanz eluiert.

Quantifizierung

Bei der quantitativen Analyse des Pflanzenmaterials wurden die Komponenten über einen Inneren Standard quantifiziert. Hierbei wurden Schwierigkeiten umgangen, die sich bei der Extraktion und Aufarbeitung der Proben ergeben. Verluste und Konzentrationsänderungen der Analysenlösung sowie Injektionsungenauigkeiten und Schwankungen in der Lampenleistung werden ausgeglichen. Für die untersuchten Gewebe erwies sich die Substanz Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid) als geeignet und erfüllte die an einen Inneren Standard gestellten Bedingungen: Die Substanz sollte in den untersuchten Geweben nicht detektiert werden, sich von anderen Komponenten basisliniengetrennt eluieren lassen, eine ähnliche Retentionszeit wie die Hauptkomponenten der Untersuchungslösungen aufweisen, chemisch inert sein und in Reinstform erhältlich sein. Sie sollte in einer Konzentrationen zugefügt werden, dass die Peakhöhe denen der Hauptkomponenten entspricht (ASSHAUER 1986). Rutin mit einem Absorptionsmaximum bei 356 nm war sowohl für die Quantifizierung der Styrylpyrone (Absorptionsmaximum bei 370 nm) als auch für die Gehaltsbestimmung der Hydroxyzimtsäurederivate (Absorptionsmaximum bei 330 nm) geeignet. Als Bezugsgröße für die Gehaltsberechnung der löslichen Inhaltsstoffe diente das Trockengewicht. Die Angabe der Gehalte erfolgte in Prozent des Trockengewichts [% TG]. Mit folgender Gleichung berechneten sich die Gehalte der untersuchten Proben:

$$G = \left(\frac{FS_{(A)}}{FIS_{(A)}} a + b \right) \cdot \frac{VIS_{(A)} \cdot CIS_{(A)}}{EW \cdot CIS_{(E)} \cdot 10}$$

G	Gehalt [%TG]
FS _(A)	Fläche der Substanz in der Analyse [Integrationseinheiten]
FIS _(A)	Fläche des Inneren Standards in der Analyse [Integrationseinheiten]
FS _(E)	Fläche der Substanz in der Eichung [Integrationseinheiten]
FIS _(E)	Fläche des Inneren Standards in der Eichung [Integrationseinheiten]
CIS _(A)	Konzentration des Inneren Standards in der Analyse [mg·mL ⁻¹]
CIS _(E)	Konzentration des Inneren Standards in der Eichung [mg·mL ⁻¹]
CS _(E)	Konzentration der Substanz in der Eichlösung [mg·mL ⁻¹]
VIS _(A)	Volumen zugesetzter Innerer Standardlösung in der Analyse [mg·mL ⁻¹]
EW	Einwaage des Pflanzenmaterials [g]
b	y-Achsenabschnitt für x=0 der Kalibrierfunktion
a	Steigung der Kalibrierfunktion $a = \frac{FIS_{(E)} \cdot CS_{(E)}}{FS_{(E)}}$

Für die Berechnung von Gesamtgehalten der Stoffgruppen wurden die Gesamtsumme der Flächenwerte in obige Gleichung eingesetzt. Unbekannte Stoffe deren chemischer

Grundkörper anhand der *on-line*-UV-Spektren identifiziert werden konnten, wurden zusammen mit bekannten Substanzen gleichen Typs als Stoffgruppe berechnet. Konnten Peaks keinem chemischen Grundkörper zugeordnet werden, wurden sie nicht in die quantitativen Berechnungen miteinbezogen. Das gleiche gilt für Peaks von NebenkompONENTEN, die mit unbekanntEN Komponenten coeluierten. Die Flächenberechnung erfolgte über die BECKMAN-Software (System Gold, Version 7.0; Threshold, 0,0001; Min Peak Height 0,01). Nicht basisliniengetrennte Peaks wurden automatisch durch Fällen des Lots zur Basislinie getrennt. Peakflächen kleiner als 0,1 % der Gesamtfläche wurden für die Berechnung nicht berücksichtigt.

Die Kalibrierung der Hydroxyzimtsäurederivate wurde mit Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure, die der Styrylpyrone mit Equisetumpyron und die von Flavonoidglykosiden mit Quercetin-3-O-sophorosid durchgeführt.

2.4.4 Mikroskopie

Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren von Equisetumpyron und Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure in Methanol; 50 % *aq.* (V/V) Methanol; 10 % *aq.* (V/V) Methanol; Wasser; 50 % *aq.* (V/V) PEG 400 und 50 % *aq.* (V/V) Glycerin (87 % in Ethanol) wurden an einem PERKIN ELMER LS 50 Luminescence Fluorimeter aufgenommen.

Aufnahmeparameter:

Anregungswellenlängen: 365 nm im Spektralbereich 385-700 nm
488 nm im Spektralbereich 500-700 nm

Binominalfilter: Position 1

Scan Speed: 240 nm·s⁻¹

S-Golay Smooth Funktion; Em Slit 5

Präparationstechniken

1) Frischpräparate

Quer- und Längsschnitte durch Rhizome wurden als Handschnitte angefertigt. Gewebe (Loben) der Prothallien wurden direkt mikroskopiert. Als Einbettungsmedien dienten Wasser und 50 % *aq.* (V/V) PEG 400. Plasmolyse wurde an Frischpräparaten mit 1 M NaCl durchgeführt.

2) Dauerpräparate

Von Rhizomen und deren Wachstumsspitzen wurden 0,3-1 cm lange Sprossstücke und Sprosssegmente geschnitten. Diese wurden wie einzelne Loben von Prothallien nach dem Schema in Tabelle 2.4-3 behandelt.

Tabelle 2.4-3: Herstellung von Dauerpräparaten für die Mikroskopie.

1. Infiltrieren:	0,1 M Natriumphosphatpuffer, 4 % <i>aq.</i> (V/V) Formaldehyd 0,2 % <i>aq.</i> (V/V) Glutaraldehyd pH 6,1	0° C; 2 h fixieren
2. Entwässern:	in einer aufsteigenden Reihe mit 30, 50, 70, 85, 95, 100% <i>aq.</i> (V/V) Aceton	jeweils 20 min
3. Einbetten:	Acrylharz : Aceton; 1:1 (V/V) 100 % Acrylharz	15 h 2 x 15 h
4. Aushärten:	In Gelatinekapseln	45° C, 10 h

An einem Rotationsmikrotom wurden Dünnschnitte von 3,5-10 µm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden mit Entellan eingedeckelt.

Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopische Techniken

Die Untersuchungen erfolgte an zwei Geräten:

1) Ortholux II

Das LEITZ Forschungsmikroskop Ortholux II, ausgestattet für Fluoreszenzmikroskopie mit Binokulartubus FASA und Orthomat-W-Fotoaufsatz, wurde für routinemäßige Untersuchungen eingesetzt. Als Lichtquelle für Durchlichtbetrachtungen im Hellfeld dient eine Halogenlampe, für fluoreszenzmikroskopische Betrachtungen eine Hg-Höchstdrucklampe.

2) Axiovert-100

Die Untersuchungen wurden mit einem LSM-Axiovert 100, CARL ZEISS (Software CARL ZEISS LSM, Version 3,58 Beta/1994) durchgeführt, mit dem sowohl Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) als auch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie betrieben werden kann. Die Lichtquelle ist hier eine Hg-Höchstdrucklampe. Durch Kombination von Bandpassfiltern stehen drei Anregungs- und drei Emissionsbereiche zur Verfügung siehe Tabelle 2.4-4. Die Kombinationen der jeweiligen Anregungswellenlängen und Emissionsbereiche für Aufnahmen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, sind ebenfalls in Tabelle 2.4-4 zusammengestellt.

Methoden

Tabelle 2.4-4: Fluoreszenzmikroskopische Techniken mit den jeweils verwendeten Anregungs- und Emissionsbereichen. Die rechte Spalte gibt an, in welchen Bildschirmfarben die Emissionsbereiche dargestellt wurden.

Typ/Gerät	Anregung [nm]	Emission [nm]	Bildschirmfarbkanal
konventionelle Fluoreszenzmikroskopie (Ortholux II)	340-380	>430	-
	450-490	>515	-
LSM (Axiovert-100)	365	400-435;515-565	blau; grün;
	488	>515;>590 515-565; >590	grün, rot grün; rot
konventionelle Fluoreszenzmikroskopie (Axiovert-100)	340-380	435-485	blau
	460-500	510-560	grün
	515-560	573-648	rot

2.4.5 Isolierung und Strukturaufklärung von Styrylpyronen

Extraktion

A) Aus Rhizomen von *Equisetum hyemale* L.

500 g gefriergetrocknete, fein pulverisierte Rhizome wurden in Portionen von je 50 g unter Rückfluss mit je 300 mL siedendem Methanol (100 %) viermal extrahiert. Der vereinigte Extrakt wurde insgesamt auf ein Volumen von 250 mL eingengt, der sich dabei bildende schwer lösliche Niederschlag wurde abfiltriert und verworfen.

B) Aus Rhizomen von *Equisetum arvense* L.

180 g gefriergetrocknete, fein pulverisierte Rhizome wurden in 1 L Methanol (100 %) vorgequollen, mit 2,25 L Methanol, 0,75 L Methanol (40° C) und mit 1,5 L einer 0,96 % ammoniakalischen (V/V) Methanol-Lösung perkoliert. Die erhaltenen Fraktionen wurden nach HPLC-Analyse vereinigt und auf ein Volumen von 250 mL eingengt. Der sich dabei bildende, schwer lösliche Niederschlag wurde abfiltriert und verworfen.

Säulenchromatographie

Eine Übersicht der durchgeführten Trennschritte ist in Tabelle 2.4-5 dargestellt.

Tabelle 2.4-5: Übersicht der durchgeführten Trennschritte zur Isolierung der Styrylpyrone P4, P2, P12 und Equisetumpyron (EP).

Schritt	Trennweg A zur Isolierung von P4, P2 und EP	Trennweg B zur Isolierung von P12
1	Polyamid MeOH → MeOH/NH ₃ (0,96 %, V/V)	Polyamid MeOH → MeOH/NH ₃ (0,96 %, V/V)
2	Sephadex AI MeOH:H ₂ O; 80:20 (V/V)	Sephadex BI MeOH:H ₂ O; 80:20 (V/V)
3	Sephadex AII H ₂ O:MeOH; 95:5 (V/V)	Sephadex BII H ₂ O:MeOH; 60:40 (V/V)
4 / 4'	Sephadex AIII H ₂ O	Präparative HPLC Gradientenelution
	Lobar-Fertigsäule– RP-18 Gradientenelution	
5		Sephadex BIII Aceton : Methanol: H ₂ O; 2:1:1 (V/V/V)

Trennung an MN-Polyamid SC-6; Säule A und B1

Vorbehandlung des Materials:

In Wasser vorgequollenes Material (250 g) wurde solange mit Wasser gespült, bis der Überstand frei von Schwebeteilchen war, anschließend erst mit 500 mL 1 % (w/V) NaOH-Lösung, dann mit 500 mL 1 % (w/V) Na-EDTA-Lösung gespült. Nach Neutralwaschen mit Wasser wurde mit 500 mL 1 % aq. (V/V) Essigsäure gespült. Nach erneutem Neutralwaschen wurde das Material schrittweise auf Methanol equilibriert.

Das Säulenbettvolumen betrug 990 mL bei einem Säuleninnendurchmesser von 6 cm. Nach Auftragen des Extraktes wurde mit 2,5 L Methanol und 2 L 0,96 % ammoniakalischer (V/V) Methanol-Lösung eluiert. Das Sammelvolumen betrug 0,5 L, die Fraktionen wurden am Vakuumrotationsverdampfer (35° C; 50-150 mbar) eingengt und anschließend dünnschicht- sowie hochleistungsflüssigkeitschromatographisch untersucht. Fraktionen, die frei von aliphatischen Verbindungen waren, wurden vereinigt und an Sephadexmaterialien weiter aufgetrennt.

Trennung an Sephadex

Vorbehandlung des Materials Sephadex LH-20[®] erfolgte wie bei Polyamid beschrieben. Bis auf Säule A III, bei der Sephadex G-25-80[®] als Trennmateriale verwendet wurde, waren alle anderen Sephadex-Säulen mit Sephadex LH-20[®] gepackt.

Säule A I

Die Säule hatte ein Säulenbettvolumen von 495 mL bei einem Säulendurchmesser von 3 cm. Die Elution erfolgte mit 2,5 L 80 % *aq.* (V/V) Methanol. Das Sammelvolumen betrug 10 mL. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch (DC Methode 1) und mittels HPLC-Analyse (Gradient I) analysiert und anschließend in fünf Sammelfractionen vereinigt, im Vakuum (35° C; 50-150 mbar) eingengt und gefriergetrocknet.

Säule A II

Nach Reinigung der Säule A II mit der folgenden Reinigungsreihe: Wasser, 100 mL 1 % (w/V) Na-EDTA-Lösung, Wasser, 100 mL 0,1 % (V/V) HCl, Wasser wurde diese Säule auf 5 % *aq.* (V/V) Methanol äquilibriert. Die Elution erfolgt mit 6,7 L 5 % *aq.* (V/V) Methanol. Das Sammelvolumen betrug 15 mL, die Fraktionen wurden nach Analyse (siehe Säule A I) in 10 Sammelfractionen vereinigt.

Säule A III

Das Säulenbettvolumen betrug 245 mL. Das Material war mit Wasser äquilibriert. Die Elution erfolgte mit 1 L Wasser. Das Sammelvolumen betrug 10 mL. Die Fraktionen wurden nach Analyse (siehe Säule A I) in 4 Sammelfractionen vereinigt und gefriergetrocknet.

Säule B I

Die Säule hatte ein Säulenbettvolumen von 389 mL bei einem Säulendurchmesser von 3 cm. Die Elution erfolgte mit 2,7 L 80 % *aq.* (V/V) Methanol. Das Sammelvolumen betrug 15 mL. Die Fraktionen wurden nach Analyse (siehe Säule A I) in vier Sammelfractionen vereinigt, im Vakuum eingengt und anschließend gefriergetrocknet.

Säule B II

Nach Reinigung der Säule B I mit 500 mL 100 % Methanol wurde diese Säule mit 40 % *aq.* (V/V) Methanol äquilibriert. Die Elution erfolgte mit 900 mL 40 % *aq.* (V/V) Methanol. Das Sammelvolumen betrug 12 mL, die nach Analyse (siehe Säule A I) in vier Sammelfractionen vereint wurden.

Säule BIII

Die Säule hatte ein Bettvolumen von 12 mL und diente zur Nachreinigung der mit präparativer HPLC getrennten Substanzen. Äquilibrierung und Elution erfolgte mit einem Aceton-Methanol-Wasser Gemisch (2:1:1, V/V/V). Nach optischer Kontrolle wurde ein Vor- und Nachlauf von je 3 mL und eine Hauptfraktion von 5 mL aufgefangen.

Lobar-Säule

Verwendet wurde eine Lobar-Fertigsäule der Größe B (310-25), LiChroprep RP-18 (40-63mm), MERCK. Durchfluss: 1 mL·min⁻¹, Pumpen der WATERS HPLC-Anlage. Gradientenelution: beginnend mit einer Mischung Methanol: 0,1 % *aq.* (V/V) Essigsäure 23:77 wurde nach vollständiger Elution der erwarteten Bande in 1 % Schritten auf ein

Mischungsverhältnis von 31:69 verändert. Die Elution der Substanzen konnte einerseits mit einer UV-Lampe, die an die Säule gehalten wurde und andererseits mit Hilfe des Mehrkanal UV/VIS-Detektors verfolgt werden. Nach Analyse der Fraktionen wurden sie zu 20 Sammelfractionen vereinigt, gefriergetrocknet und gewogen.

Präparative HPLC

Beckmann-Anlage

Säule:	Typ SNC, Spherisorb ODS 1(5 µm, 80 Å) mit Vorsäule
Fließmittel A:	100 % Methanol
Fließmittel B:	Methanol : 1 % aq. Essigsäure (pH 2,7) 23 : 77 (V/V)
Durchfluss:	1,4 mL·min ⁻¹
Probenschleife:	20 µL
Injektion:	pro Lauf 80 µL bei reduziertem Durchfluss 0,2 mL·min ⁻¹
Gradient I:	0 min, 100 % B, 2,6 min isokratisch 100 %B, innerhalb 11 min linear auf 89,5 % B, 23,4 min isokratisch 89,5 % B, innerhalb 26 min linear auf 49 % B, 2 min isokratisch 51,9 % B, innerhalb 2 min auf 0 % B, 8 min isokratisch 0 % B.
Gradient II:	0 min, 100 % B, 0,5 min isokratisch 100 % B, innerhalb 62,5 min linear auf 51 % B, innerhalb 20 min linear auf 0 % B, 14 min isokratisch 0 % B
Equilibrierphase:	21 min isokratisch 100 % B
Detektion:	Die Elution wurde anhand der <i>on-line</i> UV-Spektren am Detektor verfolgt. Am Detektorausgang wurden einzelne Fraktionen aufgefangen

Dünnschichtchromatographie:

DC1:

Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄

Fließmittel: Ethylacetat : Wasser : Essigsäure : Ameisensäure
(100:26:12:12 V/V/V/V)

Detektion: UV₃₆₆

Bedampfen mit 32 % Ammoniak, UV₃₆₆

Besprühen mit Naturstoffreagenzlösung

(Naturstoffreagenz A; 1 % w/V in Methanol)

UV₃₆₆

Nach Ammoniakbedampfung zusätzliches Besprühen mit PEG

(5 % V/V PEG 400 in Methanol)

Besprühen mit Anisaldehyd-Sprühreagenz (DAB 9) und 3 min Erhitzen
auf 120°C

DC2:

Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄

Fließmittel: Ethylacetat : Wasser : Essigsäure : Ameisensäure
(100:6:6:6 V/V/V/V)

Detektion: siehe DC1

HPLC-Analytik

Durchführung der HPLC-Analytik der erhaltenen Fraktionen siehe Abschnitt 2.4.3 (Gradient I).

Massenspektroskopie

Die FAB-Massenspektren wurden an einem FINNIGAN MAT 8430 Spektrometer in einer Glycerin-Matrix aufgenommen.

HPLC-MS

Säule:	Vertex-Eco-Säule
Fließmittel :	50 % aq. (V/V) Methanol mit Trifluoressigsäure 0,1 % (V/V)
Durchfluss:	0,2 mL·min ⁻¹
Probenschleife:	5 µL
Detektion:	UV370
Ionisation:	ESI mit Argon als Kollisionsgas (2 mTorr)
Potential:	4kV
Kollisionsenergie	18eV, Positiv-Ionen-Modus
Weitere Geräteparameter:	ESI +Q3MS LMR UP LR

Kernresonanzspektroskopie

Die Messungen erfolgten an einem BRUKER-PHYSIK WM 400 Spektrometer mit einer Messfrequenz von 400 MHz bzw. an einem BRUCKNER AC 300 Spektrometer bei 303 K (300 MHz) in Deuterium-Methanol (CD₃OD) bzw. in DMSO-d₆. Die ³J-2D-¹H¹³-C-COSY-Spektren wurden unter inversen Bedingungen mit Bruckner INVDRLP Pulse Sequenz aufgenommen und waren für ~ 8 Hz Fernkopplung optimiert. Chemische Verschiebungen [ppm] beziehen sich auf Tetramethylsilan (=0), Kopplungskonstanten wurden in Hz als Absolutbeträge angegeben. Lösungsmittelsignale dienten als Innerer Standard.

2.5 Synthese und Reinigung von Hydroxycinnamoyl-Coenzym A-Estern

Umkristallisierung der zur Synthese von Kaffeoyl-CoA verwendeten Kaffeesäure

Die Kaffeesäure wurde unter Stickstoffatmosphäre in 40 % *aq.* (V/V) Methanol umkristallisiert. Dazu wurde die Kaffeesäure gelöst und mit der Menge an Aktivkohle versetzt, die der halben Menge an eingesetzter Kaffeesäure entspricht. Die Lösung wurde warm filtriert und das Methanol an einem Rotationsverdampfer (35° C; 50-150 mbar) abdestilliert. Anschließend kristallisierte die Kaffeesäure im Kühlschrank aus. Die Kristalle wurden dann gefriergetrocknet.

Reinigung der Kaffeesäure an Sephadex LH 20[®]

Eine Glassäule wurde mit Sephadex LH-20[®], das über Nacht im Fließmittel FM 1 gequollen wurde, gefüllt. Die Säule wurde solange gespült, bis das Eluat klar wurde. Die Kaffeesäure wurde in wenig Fließmittel suspendiert, anschließend erfolgte eine Methanolzugabe bis eine klare Lösung erhalten wurde. Die zu reinigende Probe wurde aufgetragen ohne die Elution zu unterbrechen. Eluiert wurde mit Fließmittel FM 1. Gesammelt wurden 70 Fraktionen zu 8 mL. Das Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Kontrolle (DC 1) der erhaltenen Fraktionen wurde zur Vereinigung der Fraktionen herangezogen, mittels HPLC (HPLC 1) wurde die Identität der Kaffeesäure nachgewiesen und die Reinheit der vereinigten Fraktion überprüft.

Synthese der Hydroxycinnamoyl-CoA Ester

Die Darstellung der Hydroxycinnamoyl-CoA Ester erfolgt über eine Umesterung des N-Hydroxysuccinimidesters, verändert nach SCHRAUDNER und ZENK (SCHRAUDNER 1992), (STÖCKIGT und ZENK 1975) siehe Abbildung 2.5-1.

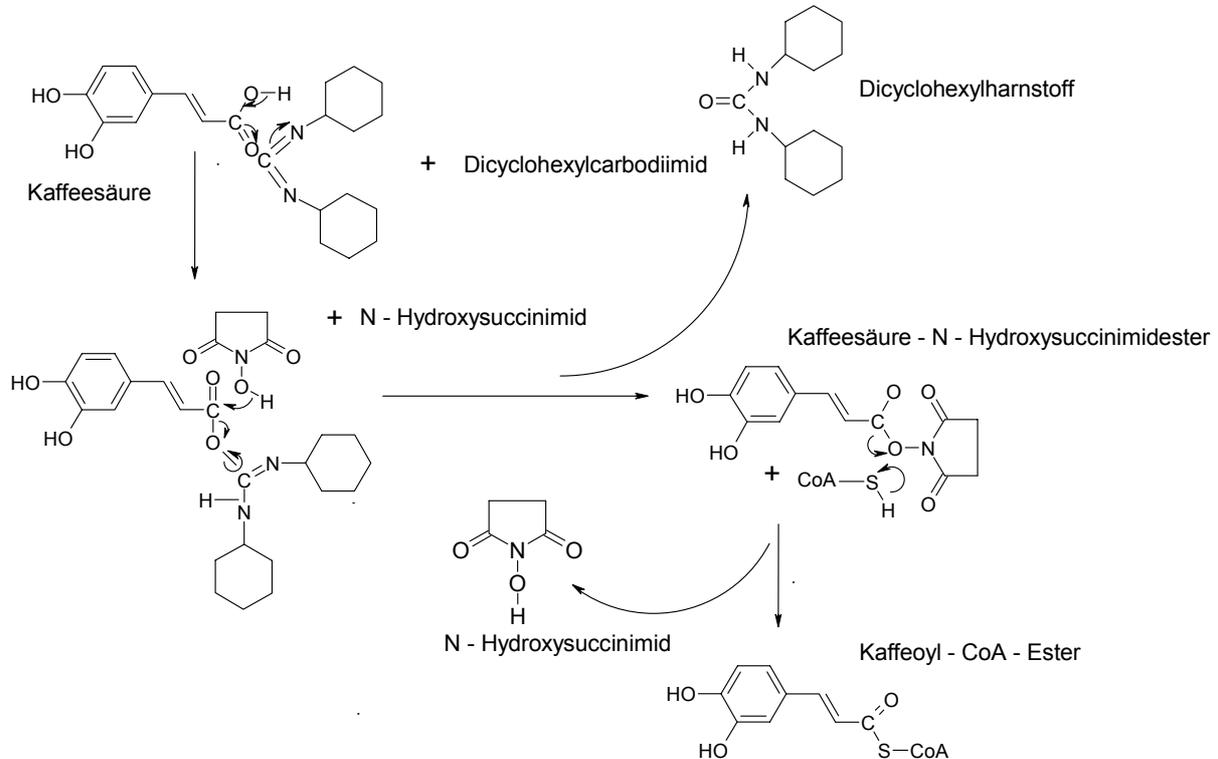


Abbildung 2.5-1: Reaktionsschema der Hydroxycinnamoyl-CoA Ester Synthese nach ZENK (ZENK 1979).

Synthese des N-(4'-Cumaroyloxy)-succinimid bzw. N-(Kaffeoyloxy)-succinimid

Dioxan, das als Lösungsmittel für die Hydroxyzimtsäuren verwendet wurde, musste direkt vor dem Gebrauch durch Filtration über Aluminiumoxid von Peroxiden befreit werden. Hydroxysuccinimid (1 mmol) und die Hydroxyzimtsäure (1 mmol) werden in Dioxan (10 mL) gelöst, danach Dicyclohexyl-carbodiimid (1,3 mmol) zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, wobei schon nach einigen Minuten ein Niederschlag beobachtet wurde. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Ethylacetat zugegeben und die während der Synthese entstandenen Nebenprodukte wie z. B. Dicycloharnstoff wurden dann über eine Glasritze abgenutscht. Das erhaltene Filtrat wurde unter Vakuum (35° C; 50-150 mbar) zur Trockene gebracht.

Reinigung der N-Hydroxysuccinimidester

Eine Glassäule (Durchmesser: 3,2 cm) wurde mit 90 g Kieselgel gefüllt, das über Nacht in Chloroform gequollen hat. Der Hydroxysuccinimidester wurde in wenig Ethylacetat gelöst, auf 5 g Kieselgel aufgezogen und danach getrocknet. Anschließend wurde dieses Kieselgel in Chloroform suspendiert, auf die Säule aufgegeben und mit reinem in Chloroform suspendiertem Kieselgel überschichtet. Ausgehend von Chloroform wurde bei der Elution der Methanolanteil erhöht: je 100 mL 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 3 %, 4 % und 5 % (V/V). Gesammelt wurden Fraktionen zu 9 mL, die Fraktionen wurden nach Kontrolle mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC 2) vereinigt. Identität und Reinheit des Produktes wurde mit Hilfe der HPLC (HPLC 2) ermittelt.

Umesterung zu den entsprechenden Hydroxycimtsäure-CoA Estern

Für die Umesterung mit Coenzym A wurden vorher die benötigten Mengen Wasser (25 mL) und Aceton (20 mL) gekocht, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Stickstoff gesättigt. Zu dem in Aceton gelösten Hydroxysuccinimidester wurde das Wasser, anschließend Natriumhydrogencarbonat (1,4 mmol) und Coenzym A (0,13 mmol) gegeben. Diese Lösung wurde weiterhin mit Stickstoff gesättigt - etwa 10 Minuten -, dann in einen vorgekühlten Exsikkator gestellt. Nachdem Vakuum angelegt war, wurde der Exsikkator mit Stickstoff gefüllt und bei 4° C für 24 Stunden dunkel gestellt. Bevor der CoA-Ester mit Ethylacetat (je 25 mL) 2 x ausgeschüttelt wurde, musste die Lösung mit Ameisensäure auf pH 3-4 eingestellt werden, um den CoA-Ester zu stabilisieren. Anschließend wurden Spuren von organischen Lösungsmitteln am Rotationsverdampfer (35° C; 50-150 mbar) abdestilliert und die restliche Lösung gefriergetrocknet.

Reinigung und Quantifizierung

Die Reinigung erfolgte sowohl an Polyamid als auch an DEAE-Sepharose FF[®].

Polyamid:

Zur Reinigung an Polyamid nach STRACK (STRACK 1988A) wurde das Trennmateriale in Wasser aufgeschlemmt, die flotierenden Schwebstoffe abgegossen bis der Überstand klar war. Anschließend wurde mit 10 % *aq.* (V/V) Ammoniak-Lösung gewaschen, dann mit Wasser neutral gewaschen, mit 10 % *aq.* (V/V) Salzsäure (500 mL) wieder aktiviert und anschließend erneut neutral gewaschen.

Nach dem Auftragen der wässrigen Esterlösung auf die Trennsäule erfolgte die Elution mit je 300 mL Fließmittel der Fließmittelreihenfolge FM 2-8. Gesammelt wurden Fraktionen zu 50 mL. Kaffeoyl-CoA wird mit 0,3 % Ammoniak während *p*-Cumaroyl-CoA mit 0,5 % Ammoniak vom Trennmateriale eluiert.

DEAE-Sepharose FF[®]:

Die Reinigung über Ionenaustauschchromatographie erfolgte an DEAE-Sepharose. Vorbereitung des Trennmaterials: Reinigung mit 0,5 M NaOH (100 mL), Natriumacetatpuffer (RP 1) (100 mL) und Equilibrierung mit 0,1 M Ameisensäure. Nach Auftragen der CoA-Ester-Lösung wurde mit einem 0,1 M Ameisensäure/Natriumacetatpuffer (RP 2)-Gradient (je 600 mL der Fließmittel bei 1,5 mL·min⁻¹ Durchfluss) mit UV-Detektion eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden am Spektralphotometer auf ihre Identität überprüft und anschließend vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden zur Überführung der Natriumsalze in die freie Säure an 80 MI Dowex 50W x 8 (gereinigt mit 200 mL 2 M HCl und mit Wasser equilibriert) chromatographiert. Der vollständige Austausch wurde über UV-Detektion und pH-Wert Kontrolle verfolgt. Die erhaltenen Fraktionen wurden zur Klärung der Identität spektralphotometrisch vermessen und mittels HPLC-Detektion (HPLC 2) auf Reinheit überprüft. Mit den erhaltenen Extinktionswerten wurden die Konzentrationen über das Lambert-Beersche Gesetz berechnet:

$$E = \epsilon_{\lambda_{\max 2}} \cdot c \cdot d$$

$\epsilon_{\lambda_{\max 2}}$ (siehe Tabelle 2.5-1); E: Extinktionswert; c: Molare Konzentration [mol·L⁻¹];

d: Dicke der Messküvette = 1cm

Tabelle 2.5-1: Absorptionsmaxima der synthetisierten CoA-Ester, Angaben nach (ZENK 1979) .

CoA-Ester	$\lambda_{\max 1}$ [nm]	$\lambda_{\max 2}$ [nm]	ϵ [cm ² ·mol ⁻¹]
Kaffeoyl-CoA	256	345	18·10 ⁶
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	256	330	21·10 ⁶

Die vereinigten Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht, anschließend mit H₂O in der gewünschten Konzentration aufgenommen und bei -20° C gelagert. Die Ausbeuten bewegten sich für eine Kaffeoyl-CoA Synthese bei 8-10 %, während bei der *p*-Cumaroyl-CoA Synthese Ausbeuten von bis 35 % erhalten wurden.

Trennbedingungen: Säulenchromatographie, Dünnschichtchromatographie und HPLC

Fließmittel:

FM 1: Methanol : Wasser : Aceton 1:1:2 (V/V/V)

FM 2: Wasser

FM 3: Methanol

FM 4: 0,01 % (V/V) Ammoniak in Methanol

FM 5: 0,05 % (V/V) Ammoniak in Methanol

FM 6: 0,1 % (V/V) Ammoniak in Methanol

FM 7: 0,3 % (V/V) Ammoniak in Methanol

FM 8: 0,5 % (V/V) Ammoniak in Methanol

Reinigungspuffer:

RP1: 1 M Ameisensäure: 0,5 M NaOH (2:1; V/V)

RP2: RP1 mit H₂O zu einer Konzentration von 0,5 M verdünnt und mit 15 mL
2 M NaOH auf pH 3,5 eingestellt

Dünnschichtchromatographie:

DC 1:

Schicht: Cellulose

Fließmittel: 15 % *aq.* (V/V) Essigsäure

Detektion: UV₃₆₆

DC 2:

Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm

Fließmittel: Chloroform : Methanol (9 : 1, V/V)

Detektion: UV₃₆₆

DC 3:

Schicht: Cellulose

Fließmittel: n-Butanol : Eisessig : Wasser (5 : 2 : 3, V/V/V)

Detektion: UV₃₆₆

HPLC

HPLC 1:

Säule:	Superspher RP 18 (e), 4 mm, 120 x 4 mm
Vorsäule:	Lichrochart RP 18-Kartusche 4 x 4 mm temperiert auf 15° C
Fließmittel A:	100 % Methanol
Fließmittel B:	Methanol: <i>ortho</i> -Phosphorsäure (0,15 % <i>aq.</i> (V/V) pH 2,0) 23 : 77 (V/V)
Durchfluss:	1 mL·min ⁻¹
Probenschleife:	20 µL
Gradient:	0 min 100 % B, 3,6 min isokratisch 100 % B, innerhalb 20,4 min linear auf 80,5 % B, 6 min isokratisch 80,5 % B, innerhalb 30 min linear auf 51,9 % B, 6 min isokratisch 51,9 % B, innerhalb 1,2 min auf 0 % B, 6 min isokratisch 0 % B.
Equilibrierphase:	25 min isokratisch 100 % B
Detektion:	UV ₃₃₀ und UV ₂₄₅ , DAD 200-400

HPLC 2:

Säule:	Nucleosil 120-5-C ₁₈ , 125 x 4 mm
Vorsäule:	Nucleosil 120-5-C ₁₈ , 11 x 4 mm temperiert auf 15°C
Fließmittel A:	1,5 % <i>aq.</i> (V/V) Phosphorsäure
Fließmittel B:	80 % <i>aq.</i> (V/V) Methanol
Durchfluss:	1 mL·min ⁻¹
Probenschleife:	20 µL
Gradient:	0 min 80 % A, innerhalb 30 min linear auf 0 % A, 5 min isokratisch 0 % A
Equilibrierphase:	15 min 80 % A isokratisch
Detektion:	UV ₃₃₀ und UV ₂₄₅ , DAD 200–400 nm

2.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach BRADFORD (BRADFORD 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bildet in sauren Lösungen mit Proteinen einen farbigen Komplex, das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei von 465 nm auf 595 nm. Die Farbintensität ist proportional zur eingesetzten Proteinmenge und wird photometrisch bestimmt. Die Reagenzlösung wurde selbst hergestellt: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 wurden in 25 mL Ethanol gelöst, anschließend mit 50 mL *ortho*-Phosphorsäure (85 %) versetzt und mit H₂O_{dest} auf 1000 mL aufgefüllt und dann zweimal filtriert. Bei jeder Messreihe wurde eine Eichreihe von 0-10 µg BSA mitgeführt.

2.7 Messung von Enzymaktivitäten

2.7.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

2.7.1.1 Extraktion der Styrylpyrronsynthase aus Gametophyten, Sporophyten und Rhizomen

1. Gametophyten

Die Methode wurde verändert nach ZUURBIER (ZUURBIER *et al.* 1993) und HOHLFELD (HOHLFELD 1996) durchgeführt. Die Gametophyten, 20-30 g Frischgewicht, wurden in einem eisgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff fein gepulvert und mit 100 mL Aufschlusspuffer PE 1 eine halbe Stunde homogenisiert. Nach 20 min Zentrifugation des Homogenats bei 22000 x g und 4° C wurde der Überstand durch Gaze filtriert und mittels Ammoniumsulfatfällung gereinigt: Zu der Rohextraktlösung wurde innerhalb von 20 min unter Rühren feingepulvertes Ammoniumsulfat, entsprechend 30 % Sättigung (ENGLARD 1990) gegeben und weitere 20 min gerührt. Der entstandene Proteinniederschlag wurde bei 22000 x g abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde in gleichem Verfahren auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 65 % gebracht. Das erhaltene Pellet wird in 2,5 mL Puffer PE 2 gelöst und mit Hilfe einer PD 10 Säule (Sephadex G-25) entsalzt und anschließend durch Ultrazentrifugation mit einer anisotropen Membran (Centricon-30[®]) etwa auf das Doppelte konzentriert. Diese Lösung wurde für die Enzymtests unter 2.7.2 und 2.8 verwendet.

2. Rhizome

Proteinextrakte aus Rhizomen wurden wie unter 1. beschrieben hergestellt, jedoch betrug das Frischgewicht der Rhizome 13,5 g bzw. 25 g bei der zweiten Wiederholung und außerdem musste zum besseren Homogenisieren des Materials Seesand zugesetzt werden.

3. Sporophyten

Proteinextrakte aus Sporophyten wurden wie unter 1. beschrieben hergestellt, jedoch mit 20 g Frischmaterial und unter Zusatz von Seesand beim Zermörsern des Materials.

Sämtliche Schritte wurden bei 4° C durchgeführt. Die Pufferlösungen wurden ebenfalls vor Gebrauch auf diese Temperatur gebracht.

2.7.1.2 Isolierung von Mikrosomen

Die Isolierung von Mikrosomen folgte einer modifizierten Vorschrift von HARRIS (HARRIS 1989). Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4° C zum Schutz der Membranen durchgeführt. Die Schritte bis zur Ammoniumsulfatfällung wurden von Absatz 2.7.1.1 1. übernommen. Der so gewonnene Rohextrakt wurde für eine Stunde bei 100000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einem Spatel in einen 2 mL Glaspotter überführt und

mit 1 mL Puffer PS 1 resuspendiert, anschließend für den Enzymtest (siehe Abschnitt 2.7.2.1) konzentriert (Centricon-30[®]). Der Überstand wurde, wie in Abschnitt 2.7.1.1 beschrieben, ammoniumsulfatfraktioniert, entsalzt und konzentriert.

2.7.1.3 Extraktion der Glykosyltransferase aus Gametophyten

Die Proteinextraktion wurde wie bereits unter 1. Gametophyten (2.7.1.1) beschrieben hergestellt. Mit Ammoniumsulfat wurde von 20 %-75 % Sättigung gefällt, anschließend der resuspendierte Proteinniederschlag in Puffer PS 2 gelöst. Die erhaltene Proteinlösung wurde durch Ultrazentrifugation mit Hilfe einer anisotropen Membran (Microcon-30) von 500 μ L auf 40–60 μ L konzentriert.

Zusammenstellung der verwendeten Pufferlösungen:

PE1: 0,1 M K-P_i, 40 mM Natriumascorbat, 3 mM EDTA, 2 mM PMSF,
14 mM β -Mercaptoethanol pH 6,8
PS1: 0,1 M K-P_i, 40 mM Natriumascorbat, 14 mM β -Mercaptoethanol,
5 % (w/V) Trehalose pH 6,8
PS2: 0,02 M K-P_i, 1,45 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5

2.7.2 Styrylpyronsynthese

2.7.2.1 Test mit anschließender HPLC-Analytik und UV-Detektion

Diese Methode wurde modifiziert von ZUURBIER (ZUURBIER *et al.* 1993) übernommen. Bedingungen für den Enzymtest: 5 μ L Malonyl-CoA (20 mM), 10 μ L Kaffeoyl-CoA (4 mM) oder *p*-Cumaroyl-CoA (4 mM), 15 μ L Enzymlösung (2,5–8,0 mg·mL⁻¹) und 70 μ L Puffer PA 1 bzw. PA 1a wurden 60 Minuten bei 30° C inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen die zur ausschließlichen Umsetzung von Kaffeoyl-CoA bzw. *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA führen festzuhalten, wurden die Substrate zusätzlich einzeln inkubiert und der Pufferanteil zu 100 μ L Testvolumen gesetzt. Die jeweiligen Blindwerte enthalten hitzedenaturierte Enzymlösungen (10 min bei 95° C). Durch Zugabe von 100 μ L Ethanol wurde die Reaktion gestoppt, bis zur HPLC-Analyse bei 4° C gelagert und vor der HPLC-Injektion kurz zentrifugiert. Die Quantifizierung der gebildeten Styrylpyrone erfolgte durch Integration der jeweiligen Peakflächen. Die Flächenberechnung erfolgte über die BECKMAN-Software (System Gold, Version 7.0 und 7.1; Threshold, 0,0001; Min Peak Height 0,01). Nicht basisliniengetrennte Peaks wurden automatisch durch Fällen des Lots zur Basislinie getrennt.

Die quantitative Bestimmung der in den *in-vitro* Enzymtests gebildeten Styrylpyrone erfolgte über eine Eichreihe mit einer Standardlösung von Hispidin, die spezifische Enzymaktivität [$\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein] wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{gebildetes Styrylpyrn}[\mu\text{mol}] \times 10^4}{\text{Protein im Test}[\text{mg}] \times \text{Zeit}[\text{s}]}$$

Faktor 10^4 : 20 μL HPLC-Injektion von 200 μL Gesamttestvolumen $\rightarrow \times 10$
Umrechnung der eingesetzten Proteinmenge auf 1 mg Protein $\rightarrow \times 1000$

HPLC-Trennbedingungen:

Säule:	Nucleosil 120-5-C ₁₈ , 125 x 4 mm
Vorsäule:	Nucleosil 120-5-C ₁₈ , 11 x 4 mm temperiert auf 15° C
Fließmittel A:	1,5 % aq. (V/V) Phosphorsäure
Fließmittel B:	80 % aq. (V/V) Methanol
Durchfluss:	1 mL·min ⁻¹
Probenschleife:	20 μL
Gradient:	0 min 80 % A, innerhalb 30 min linear auf 0 % A, 5 min isokratisch 0 % A
Equilibrierphase:	80 % A 15 min
Detektion:	UV ₃₇₀ und UV ₂₄₅ , DAD 200–400 nm

2.7.2.2 Optimierung der Proteinextraktionsbedingungen und der *in-vitro* Enzymtestbedingungen zum Nachweis einer Styrylpyronsynthase-Aktivität

In Anlehnung an HOHLFELD (HOHLFELD 1996) und an Vorschriften zur Extraktion und Durchführung von *in-vitro* Enzymtests der Chalconsynthase aus *Petroselinum hortense* HOFF. und *Daucus carota* L. sowie der Stilbensynthase aus *Pinus sylvestris* L. (BRITSCH und GRISEBACH 1985, GLEITZ und SEITZ 1989, HELLER und HAHLBROCK 1980, HRAZDINA *et al.* 1976, KREUZALER und HAHLBROCK 1972, KREUZALER und HAHLBROCK 1975A, B, KREUZALER *et al.* 1979, LANGE *et al.* 1994, SALEH und ABDALLA 1980, SÜTFELD *et al.* 1978, WELLE und GRISEBACH 1987) konnte eine SPS-Aktivität in *Equisetum arvense* L. Gametophyten nicht nachgewiesen werden. Nach einer Veröffentlichung von ZUURBIER (ZUURBIER *et al.* 1993) wurde sowohl die Proteinextraktionsvorschrift optimiert als auch die *in-vitro* Enzymtestbedingungen, die eine SPS-Aktivität mit HPLC-Analytik nachweisen kann. Variiert wurden verschiedene Parameter unter Beibehaltung der unter 2.7.1.1 und 2.7.2.1 beschriebenen Bedingungen.

Homogenisierung des Pflanzenmaterials

Variiert wurde der Gehalt an Polyklar AT. Die Konzentration (% *w/w*) wird bezogen auf das eingesetzte Frischgewicht der *Equisetum* Prothallien. Eingesetzt wurden 5, 10, 30, 50 und 60 % Polyklar AT.

Einfluss von β -Mercaptoethanol, Natriumascorbat und DTT im Extraktionspuffer

Variiert wurden verschiedene Substanzen, einzeln und in Kombination, denen nach Literaturangaben (JERVIS 1989),(GEGENHEIMER 1990) Oxidationsschutzfunktionen zugesprochen wird. Nachfolgend sind die durchgeführten Versuchsreihen aufgelistet.

- Natriumascorbat: 40 mM
- Mercaptoethanol: 14 mM
- Natriumascorbat: 40 mM mit 2,5 mM DTT
- Natriumascorbat: 20 mM mit 14 mM Mercaptoethanol
- Mercaptoethanol: 7 mM
- Natriumascorbat: 40 mM mit 14 mM Mercaptoethanol
- DTT: 5 mM

Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

In 10 % Schritten wurde eine fraktionierte Fällung im Bereich von 0-100 % durchgeführt (HARRIS 1989). Die resuspendierten Niederschläge der einzelnen Fällungen wurden zur Bestimmung des Proteingehalts und zur Messung der Enzymaktivitäten verwendet.

Entsalzung und Konzentrierung der Proteinlösung

Die Entsalzung erfolgte über PD-10 Säulen SephadexTM G-25M[®] oder für kleinere Volumina über NAPTM-5 Säulen SephadexTM G- 25[®]. Es wurde versucht diesen Schritt durch Wiederholung desselben zu optimieren. Die Konzentrierung der Proteinlösung erfolgte durch Ultrazentrifugation mit Hilfe einer anisotropen Membran.

Reaktionsabbruch

Folgende Methoden zum Abbruch der enzymatischen Reaktion wurden verwendet: Denaturierung des Proteins mittels Säure- oder Ethanolzugabe oder Ausschütteln des Reaktionsproduktes mit einem geeigneten Lösungsmittel. Zusätzlich wurde der Ansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gefriergetrocknet. Um die optimale Methode mit der besten Wiederfindungsrate zu bestimmen, wurden folgende Aufarbeitungsmethoden mit je 100 μ L einer 8 mM Hispidinlösung (gelöst in Puffer PA 1) durchgeführt:

- A: Zugabe von 2 x 200 μ L Ethylacetat mit anschließender Zentrifugation zur besseren Phasentrennung. Die vereinigten Ethylacetatphasen werden durch Begasung mit Stickstoff zur Trockene gebracht und mit 25 μ L Methanol für die HPLC-Analyse aufgenommen.
- B: Zugabe von 100 μ L Ethanol (entspricht 50 % (V/V), nach guter Durchmischung werden die gefällten Proteine abzentrifugiert.

- C: Eintauchen des Reaktionsgefäßes in flüssigen Stickstoff mit anschließender Gefriertrocknung. Aufnahme des Rückstandes in 25 µL Methanol für die HPLC-Analyse.
- D: Fällung der Proteine durch Säurezugabe: a) 0,5 M HCl im Verhältnis 1 : 1
b) 10 % TCA

Hierzu wurde die Hispidinlösung mit 20 µL Standardproteinlösung inkubiert, die mit 100 µL HCl bzw. TCA gefällt wurden. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt erfolgte die HPLC-Analyse. Gleichzeitig wurde die Stabilität des Hispidins bei Methode B über einen Zeitraum von 24 Stunden bei Raumtemperatur untersucht.

2.7.2.3 Radiometrischer Test

In Anlehnung an die Arbeit von SCHRÖDER *et al.* (SCHRÖDER *et al.* 1979), wurde eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis einer Styrylpyronsynthase-Aktivität durch Ausschütteln der ¹⁴C markierten Produkte mit Ethylacetat und anschließender Zählung in einem Scintillationsgerät entwickelt. Diese Methode fand vor allem Anwendung bei der Isolierung der Styrylpyronsynthase zum schnellen Test auf Enzymaktivität der proteinhaltigen Fraktionen.

Bedingungen des Tests:

Enzymextrakt bzw. Fraktion 50–70 µL, Kaffeoyl-CoA (40 µM) bzw. *p*-Cumaroyl-CoA (40 µM) 10 µL, 10 % (w/V) BSA 5 µL, [2-¹⁴C] Malonyl-CoA (585 pmol, 1,6 kBq) 5 µL, Puffer PA1* bzw. PA1a* zu 100 µL wurden 30 min bei 30° C bzw. 37° C inkubiert. Durch Zugabe von 200 µL Ethylacetat und zweiminütigem Vortexen wurden die Reaktionsprodukte in die Ethylacetatphase überführt. Durch Zentrifugation erfolgte eine Phasentrennung. Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte durch Auszählen von 150 µL der Ethylacetatphase.

Messung im Scintillationszähler

Die Radioaktivitätsmessung in flüssigen Proben erfolgte mit einem Scintillationszählgerät. Die Proben wurden mit Hydroluma-Scintillationscocktail (BAKER) (10 mL) Liquid Scintillator Quicksafe A (ZINSER ANALYTIK) (10 mL) oder Ultima Gold XR (PACKARD) (2 mL) gemessen. Das eingesetzte Volumen von Probe und Cocktail ist bei den einzelnen Versuchen jeweils angegeben. Die Umrechnung der cpm-Messwerte in dpm erfolgte automatisch durch das Gerät nach einer durch den Service der Firma BECKMAN mittels einer externen ¹³¹Cs-Strahlers ermittelten Quenchkurve. Gleiches gilt für das genutzte PERKIN ELMER Gerät.

Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität [$\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein] erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{(\text{dpm Probe} - \text{dpm Blindwert}) \times 1000}{\text{Zeit [s]} \times \text{Protein im Test [mg]} \times \text{spez. Radioaktivität [dpm pmol}^{-1}] \times \text{KF}}$$

KF= 0,75 x 2 :

Berücksichtigung des tatsächlichen Zählvolumens: in der Regel wurden 150 μL der ausgeschüttelten 200 μL Ethylacetatphase gezählt. Es werden pro gebildetem Styrylpyronmolekül 2 Moleküle Malonyl-CoA benötigt.

2.7.2.4 Test mit anschließender HPLC–MS / MS-Detektion

Der *in-vitro*-Enzymtest wurde wie unter 2.7.2.1 beschrieben durchgeführt.

HPLC-APCI-MS/MS Chromatographiebedingungen (HERDERICH *et al.* 1997)

HPLC:

Säule: Nucleosil 120-C₁₈, 125 x 2 mm, 5 μm

Fließmittel A: 0,005 % *aq.* (V/V) Trifluoressigsäure

Fließmittel B: 80 % *aq.* (V/V) Methanol

Drucksteuerung: 1 min mit 50 % Fließmittel A bei 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, dann Einstellung auf 0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ in einer Minute

Durchfluss: 0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Probenschleife: 5 μL

Equilibrierung: 5 min 80 % A

Gradient: 0 min, 80 % A, innerhalb 15 min linear auf 0 % A, 5 min isokratisch 0 % A

Detektion: UV₂₄₅

APCI:

Verdampfungstemperatur: 300° C, Repeller Elektrode: 20 V, 200° C, Trägergas: 70 psi,

Hilfsgas: 10 psi, Detektion . 150 – 500 u, MS / MS:Kollisions-Energie: 18 eV, Argon 1,80 mTorr

2.7.2.5 DC-Detektion der entstandenen Reaktionsprodukte

Der *in-vitro*-Enzymtest wurde wie unter 2.7.2.3 beschrieben durchgeführt.

DC – Bedingungen

Schicht:	Cellulose, 0,1 mm, 10 x 20 cm
Fließmittel:	35 % <i>aq.</i> (V/V) Essigsäure; Kammersättigung
Auftragevolumen:	80 μ L der Ethylacetatphase
Detektion:	UV ₃₆₆ Messung der Radioaktivität mit einem Linear Analyser (BERTHOLD)

2.7.3 β -Glykosyltransferase

2.7.3.1 Darstellung von 3-Hydroxyhispidin

3-Hydroxyhispidin wurde als Substrat für einen Glykosyltransferase *in-vitro*-Enzymtest durch enzymatischen Abbau aus Equisetumpyron mit β -Glucosidase in Anlehnung an Arbeiten von LEGLER und MABRY (LEGLER 1970, 1978), (MABRY 1970) dargestellt:

Equisetumpyron: 2,0 mg in 500 μ L Puffer P 2

β -Glucosidase: 2,5 mg in 500 μ L Puffer P 2

Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Durch Zugabe von 200 μ L Ethylacetat wurde die Reaktion gestoppt und durch zweiminütige Zentrifugation bei 7826 x *g* die Phasentrennung beschleunigt. Dieser Schritt wurde fünf- bis sechsmal wiederholt bis die Ethylacetatphase ohne Färbung war. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden unter Stickstoff zur Trockene gebracht, das entstandene 3-Hydroxyhispidin quantifiziert und bei -20° C gelagert.

2.7.3.2 Stabilisierung des 3-Hydroxyhispidins

Nur unter Argon und bei tiefen Temperaturen kann 3-Hydroxyhispidin stabil gelagert werden (KESSLER 1991). Daher wurden verschiedene Puffersysteme SP1-SP3 zu Stabilitätstests herangezogen.

Je Puffersystem wurden 4 Ansätze mit 90 μ L einer 1,2 mM Lösung des 3-Hydroxyhispidins bei 30° C inkubiert. Nach jeweils 15, 30, 45 und 60 minütiger Inkubationszeit wurde je zweimal mit 100 μ L Ethylacetat ausgeschüttelt. Sowohl die Ethylacetatphase, die mit Stickstoff zur Trockene gebracht wurde und in 25 μ L Methanol aufgenommen wurde, als auch die wässrige Phase wurden nach 15 und 30 min mittels HPLC analysiert (siehe 2.7.3.3). Bei einem pH-Wert von 7,6 sind bereits über 40 % des eingesetzten 3-Hydroxyhispidins abgebaut. Bei einem pH-Wert von 6,0 können nach 60 Minuten immer noch 90 % der eingesetzten Menge detektiert werden. In der wässrigen Phase wurde kein 3-Hydroxyhispidin nachgewiesen.

2.7.3.3 Test auf β -Glykosyltransferase-Aktivität mit anschließender HPLC-Analytik und UV-Detektion

In Anlehnung an HÖSEL und HRAZINDA (HÖSEL 1981, HRAZINDA *et al.* 1976) wurde der Test auf Glykosyltransferase-Aktivität durchgeführt. Bedingungen: 3-Hydroxyhispidin 4,4 mM in 20 μ L DMSO, UAP-Glucose 7,4 mM, Natriumascorbat 20 mM, Puffer P 3 zu 100 μ L Gesamtestvolumen wurden 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Gestartet wurde der Test durch Zugabe der Enzymlösung. Die Reaktion wurde durch Eintauchen des Reaktionsgefäßes in flüssigen Stickstoff abgebrochen. Nach anschließender Gefriertrocknung wurden die Substanzen in 50 μ L Methanol aufgenommen und nichtgelöste Bestandteile kurz abzentrifugiert.

HPLC-Trennbedingungen:

Säule:	Merck Superspher RP 18 (e), 4 mm, 120 x 4 mm
Vorsäule:	Lichrochart RP 18-Kartusche 4 x 4 mm temperiert auf 15°C
Fließmittel A:	0,5 % <i>aq.</i> (V/V) Phosphorsäure pH 2,0 : Methanol 77:23
Fließmittel B:	Methanol
Durchfluss:	1 mL·min ⁻¹
Probenschleife:	20 μ L
Gradient:	0 min 100 % A, 3,6 min isokratisch 100 % A, innerhalb 20,4 min linear auf 80,5 % A, 6 min isokratisch 80,5 % A, innerhalb 3 min linear auf 0 % A, 8 min isokratisch 0 % A
Equilibrierphase:	100 % A isokratisch 19,8 min
Detektion:	UV ₃₅₀ und UV ₃₃₀ , DAD 200-400 nm

Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen:

PA 1: 0,5 M K-P _i , pH 6,8	* Zusatz von Natriumascorbat: 20 mM
PA 1a: 0,5 M K-P _i , pH 7,5	
P 2: 0,2 M K-P _i , pH 5,0	
P 3: 0,2 M K-P _i , pH 7,5	
SP 1: 0,2M K-P _i , pH 7,6	
SP 2: 0,2M K-P _i , pH 6,5	
SP 3: 0,2 M K-P _i , pH 6,0	

2.8 Charakterisierung der Styrylpyronsynthese

2.8.1 Stabilisierung der Proteinlösung

Folgende Substanzen und Bedingungen wurden für eine Stabilisierung sowohl des Rohextraktes als auch partiell gereinigter Proteinfractionen getestet. Aufgelistet sind die durchgeführten Versuche in Tabelle 2.8-1.

Tabelle 2.8-1: Gewählte Bedingungen zur Abschätzung der SPS Stabilität.

Substanz	Bedingung	Messung nach
<u>Natriumascorbat</u> : 40 und 100 mM	RT	2,4, 8 und 24 Stunden
<u>Glycerin</u> : 10 % und 20 % <i>aq.</i> (V/V)	RT, 4° C, -20° C, -80° C	2, 4, 24 und 48 Stunden 1, 2, 4 Monate
<u>Mercaptoethanol</u> : 1,4, 7 und 14 mM mit 40 mM Natriumascorbat	Raumtemperatur	4 Stunden
<u>BSA</u> : 0,5 %, 1 % (w/V)	4° C	24 und 48 Stunden
<u>NaCl</u> : 50 mM und 100 mM	Raumtemperatur	4 Stunden
	- pH-Wert (pH 6,5; 7,0;8,0) -wiederholtes Schockgefrieren mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen	2 Stunden 2 x

2.8.2 Temperaturabhängigkeit

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationstemperatur für die Aktivität der Styrylpyronsynthase wurden drei Versuchsreihen mit Doppel- und Dreifachproben durchgeführt (Tabelle 2.8-2).

Tabelle 2.8-2: Zusammenstellung der gewählten Inkubationsbedingungen zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit.

	Inkubationstemperaturen [°C]	weitere Assay– Bedingungen	eingesetzter Hydroxy- Cinnamoyl-CoA-Ester
1	10, 15, 20, 22, 30, 40, 45, 50	K-P _i Puffer pH 6,8	<i>p</i> -Cumaroyl-CoA
2	10, 15, 20, 30, 40, 45	Tris pH 8,1	<i>p</i> -Cumaroyl-CoA
3	10, 15, 22, 25, 28, 30, 33, 35, 37, 40, 50, 56	K-P _i Puffer pH 6,8	Kaffeoyl-CoA

die Konzentration der Puffer betrug jeweils 500 mM

2.8.3 pH-Wert–Abhängigkeit

Zur Bestimmung der pH-Wert-Abhängigkeit der SPS für die Substrate Kaffeoyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA wurden die folgenden Puffer gewählt, jeweils in einer Konzentration von 500 mM, um einen pH-Wert–Bereich von pH 4-10 abzudecken:

Acetat: pH 4,0 / 4,2 / 4,4 / 4,8 / 5,0 / 5,5 / 5,8
 MES: pH 5,5 / 5,9 / 6,5 / 7,1
 K-P_i: pH 5,7 / 5,9 / 6,1 / 6,3 / 6,5 / 6,7 / 6,8 / 7,1 / 7,5
 Imidazol: pH 5,9 / 6,7 / 7,1 / 7,7
 Tris/HCl: pH 7,3 / 7,5 / 8,1 / 8,5 / 9,1
 Glycin: pH 8,7 / 9,1 / 9,5 / 10,1 / 10,5
 Bicin: pH 7,3
 Citrat: pH 5,6

Die Herstellung sämtlich beschriebener Puffer wurde nach HOLTZHAUER (HOLTZHAUER 1988) durchgeführt.

2.8.4 Einfluss verschiedener Substanzen auf die SPS–Aktivität

Die Aktivität der SPS wurde im Standardtest in Gegenwart von BSA, DTT, Mercaptoethanol und Natriumascorbat getestet. Die Substanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (siehe Tabelle 2.8-3).

Methoden

Tabelle 2.8-3: Eingesetzte Konzentrationen im Standardtest von BSA, DTT, β -Mercaptoethanol und Natriumascorbat.

Substanz:	Konzentration im Standardtest
BSA	0,25; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0* [%] (w/V)
DTT	-2,5 mM -1,25 mM mit 0,2 % (w/V) BSA -2,5 mM mit 0,2 % (w/V) BSA
Mercaptoethanol	0,42; 2,1; 4,2; 7,0; 14,0; 21,0 mM
Natriumascorbat	0, 16, 40 mM

*bei höheren Konzentration von BSA als 1 % (w/V) wurden die Proteine bei der Standardmethode zum Teil nur unvollständig gefällt und verursachten Probleme beim Betrieb der HPLC Anlage mit automatischer Probeninjektion.

2.8.5 Substratabhängigkeit und Bestimmung der K_m -Werte

Durch Vorversuche wurde ermittelt, welche Konzentrationen der beiden Substrate Kaffeoyl-CoA bzw. *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA für die SPS im Sättigungsbereich liegen. Ebenfalls wurde in Vorversuchen die Zeitlinearität für geringe Substrat-Konzentrationen abgeklärt und die Inkubationsdauer auf 20 min verkürzt. Für die Erstellung einer Michaelis-Menten-Kurve wurde jeweils ein Substrat in sättigender Konzentration (etwa $10 \times K_m$) eingesetzt und die Konzentration des anderen Substrates variiert. Die Bestimmung der K_m und V_{max} Werte erfolgte mit dem Programm Sigma Plot[®] (JANDEL SCIENTIFIC) durch Angleichen der Messdaten an die Michaelis-Menten-Funktion:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [A]}{K_m + [A]}$$

V_{max} : Maximalgeschwindigkeit, K_m : Michaelis-Konstante,

V : Reaktionsgeschwindigkeit, A : Substrat

2.8.6 Zeit- und Proteinabhängigkeit

Zeitabhängigkeit

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Substratumsetzung wurde die Reaktion nach 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, und 120 min gestoppt und untersucht, wie viel Reaktionsprodukte entstanden sind. Alle weiteren Bedingungen werden wie unter beschrieben beibehalten. Eingesetzt wurde ein Proteinextrakt wie unter 2.7.1.1 beschrieben.

Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge

Der Proteinextrakt, wie unter 2.7.1.1 beschrieben, wurde durch Verdünnen der Lösung mit Puffer variiert. Assaybedingungen ebenfalls wie unter 2.7.2.1 beschrieben.

2.8.7 Bestimmung des Molekulargewichtes

Zur Molekulargewichtsbestimmung der Styrylpyronsynthase kann die Gelfiltrationschromatographie herangezogen werden. Der Grad der Retardierung einer Substanz kann unter anderem durch den Verteilungskoeffizienten k_{av} beschrieben werden. Zwischen diesem und dem Molekulargewicht einer Substanz besteht eine Beziehung, die eingehend durch empirische Beobachtungen analysiert ist, während die theoretische Klärung zur Zeit noch unvollständig ist (RODBARD 1970, YARMUSH 1980). Für die Bestimmung des Molekulargewichts einer Substanz anhand einer Eichkurve wird der lineare Bereich der Kurve benutzt.

Die Gelfiltration erfolgte sowohl an einer Sephacryl S 100 16/60 Säule[®] (PHARMACIA BIOTECH) als auch an einer Superose 12 HR 10/30 Säule[®] (PHARMACIA BIOTECH). Die Sephacryl S 100-Säule hatte ein Bettvolumen von 160 mL bei einer Höhe von 60 cm. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumina Puffer RP 6 (Zusammensetzung der Puffer siehe Abschnitt 2.9; Proteinreinigung) equilibriert. Nach dem Auftragen der Probe ($0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) wurde isokratisch mit Puffer RP 6 eluiert. Im Bereich von 36-65 mL Elutionsvolumen wurden Fraktionen von 0,5 mL gesammelt und auf enzymatische Aktivität überprüft. Die Eichung der Säule erfolgte mit folgendem Gemisch aus Eichproteinen: Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa). Die Chromatographie erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Superose 12 HR-Säule hatte ein Bettvolumen von 24 mL bei einer Höhe von 30 cm. Die Säule wurde mit Puffer RP 7 equilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde mit demselben Puffer bei einer Flussrate von $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ eluiert. Die Eichung der Säule erfolgte mit folgendem Gemisch aus Eichproteinen: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa) und Ovalbumin (43 kDa) bei Raumtemperatur.

Der Verteilungskoeffizient k_{av} lässt sich durch folgende Beziehung bestimmen:

$$k_{av} = \frac{V_e - V_t}{V_t - V_0}$$

V_e = Elutionsvolumen der Substanz (Bestimmung anhand der halben Maximalsubstanzpeakhöhe)

V_0 = Ausschlussvolumen der Säule (bestimmt durch dreimalige Injektion einer Blue Dextran Lösung $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Sephacryl S 100: 36 mL; Superose 12 HR: 7 mL)

V_t = Gesamtvolumen der Säule (Sephacryl S 100: 120 mL; Superose 12 HR: 36 mL, Angaben des Herstellers)

Weiter kann eine Molekulargewichtsabschätzung aus der SDS-PAGE (Durchführung siehe auch Abschnitt 2.10.1) vorgenommen werden. Aus der Wanderungsstrecke von Proteinen mit definiertem Molekulargewicht lässt sich die Größe des zu bestimmenden Proteins über

seine Wanderungsstrecke im Gel bestimmen. Zum Vergleich wurden Myosin (200kD), β -Galactosidase (116,25 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa) und Ovalbumin (45 kDa) mitgeführt.

2.9 Proteinreinigung

Alle chromatographischen Schritte wurden an einem HiLoad[®] System (PHARMACIA BIOTECH) oder an einer FPLC-Anlage (PHARMACIA BIOTECH) durchgeführt, dies ist bei der Beschreibung der Chromatographieschritte vermerkt. Dabei waren die Puffer-Reservoirs mit Eis gekühlt, ebenso die Sammelgläschen des Fraktionssammlers. Alle Säulen waren durch Wasserkühlung auf etwa 14° C temperiert, außer die Säulen der Gelfiltrationschromatographie. Mit der Messung der Leitfähigkeit während der Chromatographie wurde jeweils die vollständige Equilibration der Säulen und der eingestellte Gradient aufgezeichnet. Die Proteinelution wurde über die Absorption bei 280 nm verfolgt, der Proteingehalt der Fraktionen wie unter Abschnitt 2.6 beschrieben bestimmt und die SPS-Aktivität über die Umsetzung von radioaktiv markiertem Malonyl-CoA (siehe Abschnitt 2.7.2.3) ermittelt. Mussten aktive Fraktionen bei -80° C gelagert werden diese vorher mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nachfolgende Liste gibt eine Übersicht der verwendeten Pufferlösungen.

- RP 1: 0,5 M K-P_i, 2 mM DTT, 40 mM Natriumascorbat, 3 mM EDTA, 2 mM PMSF, pH 6,8
- RP 2: 0,5 M K-P_i, 2 mM DTT, 40 mM Natriumascorbat, 2 mM PMSF, 10 % (V/V), Glycerin, pH 6,8
- RP 3: 0,05 M K-P_i, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 5 % (V/V) Glycerin, pH 8,3
- RP 3a: 0,05 M K-P_i, 2 mM DTT, 1 M NaCl, 2 mM PMSF, 5 % (V/V) Glycerin, pH 8,3
- RP 4: 0,05 M K-P_i, 2 mM DTT, 1 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,0
- RP 4a: 0,05 M K-P_i, 2 mM DTT, pH 7,0
- RP 5: 0,05 M K-P_i, 2 mM DTT, 1,5 M (NH₄)₂SO₄, pH 6,8
- RP 5a: 0,05 M K-P_i, 2 mM DTT, pH 6,8
- RP 6: 0,1 M K-P_i, 1 M NaCl, 2 mM DTT, pH 6,8
- RP 7: 0,05 M K-P_i, 40 mM Natriumascorbat, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 6,8
- RP 8: 0,01 M K-P_i, 2 mM DTT, 10 % (V/V) Glycerin, 2 mM PMSF, pH 6,8
- RP 8a: 0,3 M K-P_i, 2 mM DTT, 10 % (V/V) Glycerin, 2 mM PMSF, pH 6,8
- RP 9: 0,05 M K-P_i, 2 M (NH₄)₂SO₄, 40 mM Natriumascorbat, 2 mM DTT, pH 6,8
- RP 9a: 0,05 M K-P_i, 40 mM Natriumascorbat, 2 mM DTT, pH 6,8
- RP 10: 0,02 M K-P_i, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 5 % (V/V) Glycerin, pH 7,0
- RP 10a: 0,02 M K-P_i, 1 M NaCl, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 5 % (V/V) Glycerin, pH 7,0
- RP 11: 0,02 M K-P_i, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 5 % (V/V) Glycerin, pH 6,8
- RP 11a: 0,02 M K-P_i, 1 M NaCl, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 5 % (V/V) Glycerin, pH 6,8

2.9.1 Proteinextraktion (Reinigungsstufe 1)

Als Ausgangsmaterial für die Enzymreinigung wurden dreimal Gametophyten nach 4 Wochen Subkultivierungsdauer in je 150-200 g (Frischgewicht) Portionen von anhaftendem Agar-Agar getrennt. Diese wurden im Mörser mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, fein gepulvert und mit etwa dem doppeltem Volumen Aufschlusspuffer (RP 1), 50 % (w/w) unlöslichem PVP versetzt und 1 Stunde bei 4°C extrahiert. Das Homogenat wurde anschließend bei 22000 x g und 4°C 45 min zentrifugiert. Der resultierende Proteinniederschlag wurde erneut mit etwa einem Drittel Aufschlusspuffervolumen des Proteinniederschlagvolumens für eine halbe Stunde nachextrahiert und danach wieder zentrifugiert. Dieser Niederschlag wurde verworfen. Der Überstand wurde zur Entfernung von restlichen Zellbestandteilen (vor allem Membranen) bei 100000 x g 1 Stunde zentrifugiert. Dieser Überstand ergab den Rohextrakt mit etwa 250 mL pro extrahierte Portion.

2.9.2 Ammoniumsulfat–Fraktionierung (Reinigungsstufe 2)

Zu je 250 mL Rohextrakt wurde innerhalb von 15 min unter Rühren 48,5 g fein gepulvertes Ammoniumsulfat entsprechend 35 % Sättigung (ENGLARD 1990) gegeben und weitere 30 min gerührt. Der entstandene Proteinniederschlag wurde bei 22000 x g abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand (375 mL) wurde im gleichen Verfahren auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 65 % gebracht (Zugabe von 69 g Ammoniumsulfat). Der hieraus resultierende Niederschlag wurde etwa in 16 mL Puffer RP 2 suspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C gelagert.

2.9.3 Ionenaustauschchromatographie (Reinigungsstufe 3)

Die Ionenaustauschchromatographie wurde an einem schwachen Ionenaustauscher: DEAE-Sepharose FF[®] (PHARMACIA-BIOTECH) durchgeführt. Das Bettvolumen der Säule betrug etwa 100 mL bei einer Höhe von 19 cm und einem Durchmesser von 2,6 cm. Die Säule wurde mit Puffer RP 3 equilibriert. Die Proteinlösung aus Reinigungsstufe 2 wurde über Nacht gegen Puffer RP 3 dialysiert. Bei einer Flussrate von 0,5 mL·min⁻¹ wurden 25 mL Proteinlösung nach Kontrolle des pH-Wertes aufgetragen. Nach Abschluss des Auftragens wurde etwa mit 1,5 Säulenvolumina Puffer RP 3 nicht gebundenes Protein mit einer Flussrate von 1,5 mL·min⁻¹ von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte bei gleicher Flussrate mit einem linear ansteigendem Gradienten : 0 min 100 % Puffer RP 3 (0 M NaCl), innerhalb 60 min linear auf 60 % Puffer RP 3a (1 M NaCl), innerhalb 5 min linear auf 100 % Puffer RP 3a. Es wurden Fraktionen zu 3 mL aufgefangen, die mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 10 % (V/V) und mit 1 M Natriumascorbatlösung auf eine Konzentration von 20 mM durch Vorlage eingestellt wurden. Aktive Fraktionen wurden für die Hydrophobe-Interaktionschromatographie vereinigt und auf eine Konzentration von 1,5 M Ammoniumsulfat gebracht.

2.9.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie (Reinigungsstufe 4 und 5)

Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butyl Sepharose 4 FF[®]

(Reinigungsstufe 4)

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde an Butylsepharose 4 FF[®] (PHARMACIA BIOTECH) durchgeführt. Das Bettvolumen der Säule betrug 25 mL bei einem Durchmesser von 1,2 cm. Die Säule wurde mit Puffer RP 4 (1 M (NH₄)₂SO₄) equilibriert. Bei einer Flussrate von 0,6 mL·min⁻¹ wurden 25,5 mL Proteinlösung der Reinigungsstufe 3 aufgetragen. Danach wurde mit etwa 2 Säulenvolumina Puffer RP 4 nicht gebundenes Protein mit einem Durchfluss von 1 mL·min⁻¹ von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linear absteigenden Ammoniumsulfat-Gradienten in zwei Stufen: 0 min 100 % Puffer RP 4a (0 M (NH₄)₂SO₄), innerhalb 10 min auf 55 % Puffer RP 4a, 5 min isokratisch 55 % Puffer RP 4a, innerhalb 10 min linear auf 100 % Puffer RP 4a. Es wurden Fraktionen von 1,5 mL gesammelt und jede 3. bis 5. Fraktion auf SPS-Aktivität getestet. Die Fraktionen wurden mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 10 % (V/V) und mit 1 M Natriumascorbatlösung auf eine Konzentration von 20 mM eingestellt. Die aktiven Fraktionen wurden für die Hydrophobe Interaktionschromatographie vereinigt und auf eine Konzentration von 1,0 M Ammoniumsulfat gebracht.

Hydrophobe Interaktionschromatographie an RESOURCE ISO[®] (Reinigungsstufe 5)

Bei der RESOURCE ISO[®] Säule (PHARMACIA BIOTECH) sind als hydrophobe Liganden Isopropyl Reste mit einer Polystyrol/Dibenzol Matrix verknüpft. Die Säule mit einem Gelbett von 1 mL wurde mit Puffer RP 5 (1,5 M (NH₄)₂SO₄) bei einer Flussrate von 0,5 mL·min⁻¹ equilibriert. 26 mL Proteinlösung wurden bei einem Durchfluss von 0,1 mL·min⁻¹ aufgetragen. Danach wurde mit etwa 10 Säulenvolumina Puffer RP 5 nicht gebundenes Protein bei einem Durchfluss von 1,0 mL·min⁻¹ von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte in zwei Stufen eines absteigenden linearen Ammoniumsulfatgradienten: 0 min 100 % Puffer PR 5, innerhalb 15 min auf 60 % Puffer RP 5, 5 min isokratisch 60 % Puffer RP 5, innerhalb 1 min auf 100 % Puffer RP 5a (0 M (NH₄)₂SO₄). Es wurden Fraktionen von 0,5 mL gesammelt und jede 2. bis 3. Fraktion auf SPS-Aktivität getestet. Die aktiven Fraktionen wurden bei -80° C aufbewahrt.

2.9.5 Gelfiltrationschromatographie

Gelfiltration an Superose 12 HR[®]

Gelfiltration an Sephacryl S-200 HR[®]

Zur Durchführung dieser Chromatographie siehe Abschnitt 2.8.7, Bestimmung des Molekulargewichts.

2.9.6 Hydroxylapatit

Die Chromatographie an Hydroxylapatit erfolgte an verschiedenen Materialien: Hydroxylapatit der Firma CALBIOCHEM, der Firma BIORAD MacroPrep Ceramic[®] Hydroxylapatit Typ II und selbst hergestelltem kristallinen Hydroxylapatit nach einer Vorschrift von (BERNARDI). Die Säulen hatten ein Bettvolumen von 19 mL bei einer Höhe von 9 cm. Die Säulen wurden mit Puffer RP 8 (0,01 M K-P_i) bei einem Durchfluss von 0,5 mL·min⁻¹ equilibriert. Nach Auftragen der Probe bei einem Durchfluss von 0,1 mL·min⁻¹ wurde nicht gebundenes Protein mit 1,5 Säulenvolumina bei einem Durchfluss von 0,5 mL·min⁻¹ von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem ansteigenden Kaliumphosphatgradienten in 60 Minuten auf 100 % Puffer RP 8a (0,3 M K-P_i) bei einem Durchfluss von 0,5 mL·min⁻¹. Gesammelt wurden Fraktionen zu 1 mL und jede 3. bis 5. wurde auf SPS-Aktivität getestet. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und bei -80° C aufbewahrt.

2.9.7 Hydrophobe Interaktionschromatographie an weiteren HIC-Medien

Hydrophobe Interaktionschromatographie an Alkyl-Sepharose HR 5/5[®]

Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde ebenfalls an einer Alkyl-Sepharose Säule HR 5/5[®] der Firma PHARMACIA BIOTECH durchgeführt (FPLC). Das Volumen des Gelbettes betrug 1 mL. Die Säule wurde mit Puffer RP 9 (2 M (NH₄)₂SO₄) equilibriert, Die Flussrate betrug 0,5 mL·min⁻¹. Die Proteinlösung (5 mL) nach Reinigungsstufe 3 wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung (4 M) auf 2 M eingestellt und anschließend mit einer Flussrate von 0,5 mL·min⁻¹ auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftragen der Probe wurde mit 10 Säulenvolumina Puffer RP 9 nicht gebundenes Protein von der Säule gespült. Die Elution erfolgte mit einem absteigenden Ammoniumsulfat-Gradienten 2 bis 0 M (NH₄)₂SO₄ (Puffer P 9a) in 60 min. Es wurden Fraktionen von 0,5 mL gesammelt. Die Fraktionen mit SPS Aktivität wurden vereinigt mit Glycerin zu 10 % (V/V) versetzt, schockgefroren und bei -80° C gelagert.

Hydrophobe Interaktionschromatographie – HiTrap HIC Test Kit[®] und RESOURCE

HIC Test Kit[®]

Die Eignung verschiedener HIC Materialien wurde mit einem HiTrap HIC Test Kit[®] der Firma PHARMACIA BIOTECH überprüft. Es beinhaltet fünf verschiedene Säulen (Phenyl Sepharose HP[®], Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)[®], Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)[®], Butyl Sepharose 4 Fast Flow[®] und Octyl Sepharose 4 Fast Flow[®]) mit jeweils einem Bettvolumen von 1 mL. Die Säulen wurden mit Puffer RP 4 equilibriert. Als Probe wurde jeweils ein in 2 mL aufgenommener Proteinniederschlag aus der Reinigungsstufe 2 bei einem Durchfluss von 1,0 mL·min⁻¹ aufgetragen. Anschließend wurde mit Puffer RP 4 nachgewaschen um nicht gebundenes Protein von der Säule zu spülen. Die Elution erfolgte mit einem absteigenden Ammoniumsulfatgradienten von 2 bis 0 M (NH₄)₂SO₄ (Puffer P 4a) in

15 min bei einem Durchfluss von $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Es wurden Fraktionen von 1,5 mL gesammelt und jede 2. bis 3. auf SPS-Aktivität überprüft.

Die Eignung einer HIC RESOURCE[®] Säule der Firma PHARMACIA BIOTECH wurde durch Testen eines angebotenen Kits ermittelt. Der Kit enthielt drei gepackte Säulen deren Matrizen mit Phenyl-, Ethyl und Isopropylresten derivatisiert waren. Die Chromatographie erfolgte mit einem absteigenden Ammoniumsulfatgradienten von 1,5 bis 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 30 min bei einem Durchfluss von $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Vor dem Auftragen wurden die Proben eine Stunde bei $100000 \times g$ zentrifugiert.

2.9.8 Ionenaustauschchromatographie an weiteren Materialien

Die Ionenaustauschchromatographie wurde an zwei weiteren, stärker bindenden Kationen Austauschermaterialien durchgeführt (HiTrap Q[®], PHARMACIA BIOTECH und Source Q 15[®], PHARMACIA BIOTECH) und an einem Anionenaustauschermaterial (HiTrap Sp[®], PHARMACIA BIOTECH).

Das Bettvolumen der HiTrap Q-Säule betrug 1 mL. Equilibriert wurde die Säule mit Puffer RP 10. Die über HiTrap Desalting Columns[®] entsalzte und umgepufferte Proteinlösung von Reinigungsstufe 2 wurde mit einer Flussrate von $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}$ aufgetragen. Nicht gebundenes Protein wurde mit 3 Säulenvolumina Puffer RP 10 von der Säule gespült. Anschließend wurde mit einem linear ansteigenden Gradienten eluiert: 0 min 100 % Puffer RP 10 (0 M NaCl), innerhalb 5 min 100 % Puffer RP 10a (1 M NaCl). Es wurden Fraktionen von 0,8 mL Volumen gesammelt und auf SPS-Aktivität getestet.

Das Bettvolumen der Source Q 15-Säule betrug 8 mL. Equilibriert wurde das Material mit Puffer RP 11 bei einer Flussrate von $1 \text{ mL}\cdot\text{min}$ wurde die Proteinlösung (Vorbereitung wie bei HiTrap Q beschrieben) aufgetragen. Nach dem Spülen der Säule von ungebundenem Protein mit 2 Säulenvolumina Puffer RP 11 erfolgte die Elution mit einem linear ansteigenden Gradienten: 0 min 100 % Puffer RP 11 (0 M NaCl), innerhalb 15 min 100 % Puffer RP 11a (1 M NaCl). Die proteinhaltigen Fraktionen (das Sammelvolumen betrug 0,5 mL) wurden auf SPS-Aktivität getestet.

Das Bettvolumen der HiTrapSP Säule betrug 1 mL, Die Chromatographie wurde genau wie bei HiTrapQ beschrieben durchgeführt.

2.10 Elektrophorese

2.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen der einzelnen Proteinfractionen während der Reinigung erfolgte nach (LÄMMLI 1970) mit einem Penguin water-cooled dual-

gel Electrophoresis System P9DS-2 (OWL SCIENTIFIC, Inc). Als Spannungsquelle war eine Consort E835 Electrophoresis Power Supply (OWL SCIENTIFIC, Inc) angeschlossen.

Denaturierung der Proteinproben

Die Proteinproben (je 5–10 µg) wurden mit 1 mL gekühlter 10 % *aq.* (V/V) Trichlor-essigsäure versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend 15 min bei 6000 x *g* zentrifugiert (4° C). Der Überstand wurde dekantiert und der Proteinniederschlag zweimal mit Diethylether : Ethanol (1:1, V/V) gewaschen und getrocknet (Trockenschrank 40°C, 30 min).

Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Die Proben wurden in 20 µL Probenpuffer GEP 1 aufgenommen und 10 min bei 95°C inkubiert. Zur Vermeidung von zwei Artefaktbanden in BSA-Höhe bei einer anschließenden Silberfärbung wurden die Proben nach der Reduktion mit Jodacetamid behandelt (HASHIMOTO 1983). Die Proteintrennung erfolgte in einem diskontinuierlichen Gelsystem mit 4 % Sammel- und 12 % Trenngel. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung für etwa drei Stunden zunächst bei 80 V und später bei Eintritt der Bromphenolblaubande in das Trenngel bei 180 V. Die Trenngelgröße beträgt ungefähr 130 x 60 mm bei einer Gelstärke von 0,8 mm. Die Größe des Sammelgels richtet sich nach der Menge des Probenvolumens und variierte zwischen 10 und 20 mm. Als Markerproteine wurden Myosin (200 kDa), β-Galactosidase (116,25 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa) und Ovalbumin (45 kDa) mitgeführt.

2.10.2 Silberfärbung

Die Gele der SDS-PAGE wurden anschließend einer Silberfärbung, modifiziert nach der Vorschrift von (BLUM und AMES 1989) unterzogen.

Vorgehensweise:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. Fixieren der Proteine im Gel: | Fixierlösung 15 min bis ∞ |
| 2. Waschen : | in Waschlösung I 3 x 10 min dann
in Waschlösung II genau 1 min
(erhöht den Nachweis von Proteinbanden im pg-
Bereich) dann in
Waschlösung III, 2 x 20 s |
| 3. Färben: | mindestens 15 min in der Färbelösung |
| 4. Waschen: | in Waschlösung III 1 x 20 s |
| 5. Entwicklung: | bis zur Sichtbarkeit der Banden im Entwickler |
| 6. Stop : | 2 x 1 Minute mit Stöplösung I dann
Stöplösung II 1 x 1 min dann
Stöplösung III 1 x 10 min |
| 7. Aufbewahrung: | mindestens 10 min in der Aufbewahrungslösung |

Methoden

Die Gele wurden zwischen Folie unter Vakuum bei 90°C für 2 Stunden auf einem Gelrockner getrocknet.

Lösungen und Pipetierschemen für die Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung

Pufferlösungen:

Probenpuffer GEP 1:

Stammlösung:

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 1,2 mL

H₂O *bidest* 4,8 mL

Glycerol 1,0 mL

10 % (w/V) SDS 2,0 mL

0,1 % (w/V) Bromphenolblau 0,5 mL

frisch vor Gebrauch: Zusatz von Mercaptoethanol im Verhältnis 1:20

Elektrophoresepuffer: 0,25 M Tris/HCl; 1,92 M Glycin; 1% (w/V) SDS; 10-fach konzentriert hergestellt und vor Gebrauch verdünnt.

Lösungen zur Silberfärbung:

Fixierlösung: 50 % *aq.* (V/V) Methanol; 12 % *aq.* (V/V) Essigsäure;

0,05 % *aq.* (V/V) Formaldehyd (37 %)

Waschlösung I: 50 % *aq.* (V/V) Ethanol

Waschlösung II: 0,02 % *aq.*(w/V) Natriumthiosulfat

Waschlösung III: H₂O *bidest*

Färbelösung: 0,2 % *aq.*(w/V) Silbernitrat,

0,075 % *aq.*(V/V) Formaldehyd (37 %)

Entwickler: 6 % *aq.* (w/V) Natriumcarbonat,

0,05 % *aq.* (V/V) Formaldehyd (37 %),

0,4 % *aq.* (w/V) Natriumthiosulfat

Stoplösung I: H₂O *bidest*

Stoplösung II: 50 % *aq.* (V/V) Essigsäure

Stoplösung III: Methanol 12 % *aq.* (V/V)

Aufbewahrungslösung: 30 % *aq.*(V/V) Methanol, 3 % *aq.*(V/V) Glycerin

Methoden

Gelpipetierschema:

Sammelgel (4 %):		Trenngel (12 %):	
H ₂ O	6,1 mL	H ₂ O	5,0 mL
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	2,5 mL	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	3,7 mL
Acrylamidstammlösung*	1,3 mL	Acrylamidstammlösung*	4,0 mL
Entgasungsschritt		Entgasungsschritt	
10 % (w/V) SDS	100 µL	10 % (w/V) SDS	150 µL
10 % (w/V) APS	50 µL	10 % (w/V) APS	75 µL
TEMED	4 µL	TEMED	7,5 µL
*Acrylamidstammlösung: 30 % <i>aq.</i> Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid.			

3 ERGEBNISSE

3.1 Strukturaufklärung von Styrylpyronen

HPLC-Analysen methanolischer Extrakte aus Rhizomen von *Equisetum arvense* L. zeigten neben den bisher bekannten Verbindungen Equisetumpyron (**19**) und Dikaffeoyl-meso-weinsäure (**50**) fünf weitere Verbindungen ((**31**), (**36**), (**37**), (**39**) und (**41**)) (siehe Abbildung 3.1-1; die Peaknumerierung bezieht sich auf Tabelle 7.1-1 im Anhang), die aufgrund ihrer *on-line* UV-Spektren als Styrylpyrone identifiziert werden konnten. Das Maximum mit stärkster Absorption lag wie bei Equisetumpyron im langwelligigen UV-Bereich ($\lambda > 357$ nm). Da in Rhizomen weniger störende Begleitkomponenten zu erwarten waren, wurden die Komponenten (**36**) und (**39**) aus diesen Organen isoliert. Obwohl beide Komponenten nach Trennweg A4 (siehe Abschnitt 2.4.5) in Mischung vorlagen, konnten alle NMR-Signale aufgrund der auf Konzentrationsunterschieden beruhenden Signalstärken im $^1\text{H-NMR}$ eindeutig zugeordnet werden. Als Beispiele sind in Abbildung 3.1-3 das $^1\text{J-}^2\text{D-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -heterokorrelierte NMR-Spektrum und in Abbildung 3.1-4 sowie in Abbildung 3.1-5 Ausschnitte des $^3\text{J-}^2\text{D-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -heterokorrelierte NMR-Spektrums abgebildet. Mit Trennweg A4' konnte (**36**) in genügender Reinheit erhalten werden, so dass massen-spektroskopische Untersuchungen vorgenommen wurden. Komponente (**39**) wurde auf diesem Weg in 96 %iger Reinheit erhalten (Flächenanteil bei 350 nm in HPLC-Trennung). Diese Substanz wurde ebenfalls massenspektroskopisch untersucht (siehe Abbildung 3.1-7). Auf NMR-Messungen wurde verzichtet, da bereits aufgrund der Ergebnisse der NMR-Messung des Komponentengemisches die Struktur dieser Verbindung eindeutig aufgeklärt werden konnte.

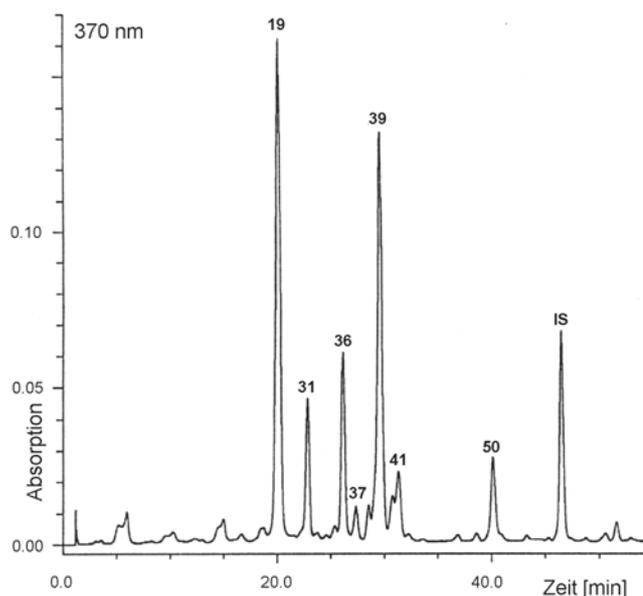


Abbildung 3.1-1: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes aus Rhizomen von *Equisetum arvense* L..

3'-Dehydroxyequisetumpyron (36)

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigen die aromatischen Protonen die typische Aufspaltung eines AA'BB'-Spinsystems mit den zwei charakteristischen Dupletts bei 7.41 und 6.76 ppm und Kopplungen von 8.1 bzw. 9.3 Hz. Das Kopplungsmuster konnte durch $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ bestätigt werden. Das Integral im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ergab vier Protonen, womit die 1',4'-Disubstitution im Aromaten hinreichend belegt ist. Die Dupletts bei 6.94 und 6.61 ppm mit einer Kopplungskonstante von 16 Hz sind den beiden trans-ständigen olefinischen Protonen zuzuordnen. Diese Signale entsprechen auch den Verschiebungen, die bei anderen Styrylpyronen gefunden wurden (vergleiche auch Daten von 3'-Dehydroxyequisetumpyron, Equisetumpyron, 5,6-Dehydrokawain, Hispidin, 4-Methoxyhispidin sowie *p*-Cumarsäure; Tabelle 3.1-2 und Tabelle 3.1-3). Aufgrund der Kopplung im 2D $^1\text{J-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -heterokorrelierten NMR-Spektrum konnte das verbleibende Singulett bei 5.89 ppm als H-5 identifiziert werden. Die Zuordnung der $^{13}\text{C-NMR}$ -Signale erfolgte mit Hilfe von 2D $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -heterokorrelierten NMR-Spektren, die auf $^1\text{J-}$ und $^3\text{J-C-H}$ Kopplungen (long-range-Kopplungen) optimiert waren. Mit Hilfe dieser Technik konnten alle Signale zweifelsfrei zugeordnet werden (siehe Abbildung 3.1-3). Die Multiplizitäten (siehe Tabelle 3.1-2 und Tabelle 3.1-3) ergaben sich aus Polarisationstransfer (DEPT). Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigte die typischen Signale einer β -D-Glucose, das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum das typische Duplett des anomeren Protons. Es musste sich daher bei der Verbindung um ein Glucosid handeln. Die Verknüpfung mit dem Zucker konnte aus dem Kreuzsignal im $^3\text{J-2D-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -heterokorrelierten Spektrum vom anomeren Proton (4.38 ppm) und dem Kohlenstoff bei 124 ppm abgeleitet werden (siehe Abbildung 3.1-4). Der Kohlenstoff konnte aufgrund seiner übrigen Kopplungsmuster und im Vergleich mit bekannten Verbindungen (siehe Tabelle 3.1-2 und Tabelle 3.1-3) als C-3 zugeordnet werden. Zusätzlich konnten in 2D-NOESY-Spektren keine Kern-Overhauser Effekte (NOE) von den Zuckerprotonen zu Protonen des Styrylsystems beobachtet werden, was mit der Glucosidierung des Pyronteils kompatibel war. In Verbindung mit den für Styrylpyronen typischen Maxima der UV-Spektren und der relativen Masse von 408, ($[\text{M-H}]^- = m/z$ 407; siehe Abbildung 3.1-6) die sich aus dem FAB-MS-Spektren ergab, konnte die Substanz eindeutig als (3,4-Dihydroxy-6-(4'-hydroxy-E-styryl)-2-pyron-3-O- β -D-glucopyranosid) identifiziert werden.

p-Methoxyequisetumpyron (39)

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ergab sich im Styrylteil das 1',3',4'-OH-Substitutionsmuster zweifelsfrei aus den Signalen der drei aromatischen Protonen (ABX-Spinsystem) mit ihren typischen Verschiebungen und Kopplungen im Vergleich zu entsprechenden Hydroxymitsäurederivaten (VEIT *et al.* 1991B) und gleich substituierten Pyronen wie beispielsweise Equisetumpyron, 4-Methoxyhispidin und Hispidin. Die übrigen Signale konnten entsprechend Verbindung 1 zugeordnet werden. Ein Methylprotonen-Signal bei 3.77 ppm zeigte im 2-D-NOESY-Spektrum eindeutige NOE mit H-5' im Styrylteil und eine $^3\text{J-}$ Fernkopplungskorrelation im $^3\text{J-2D-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -heterokorrelierten Spektrum zu D-4', woraus sich eine Methylierung der 4'-OH-Gruppe ergab (siehe Abbildung 3.1-5).

Ergebnisse

In Verbindung mit den für Styrylpyronen typischen Maxima der UV-Spektren und der relativen Masse von 438 ($[M-H]^- = m/z$ 437; siehe Abbildung 3.1-7), die sich aus den FAB-MS-Spektren ergab, konnte die Substanz eindeutig als (3,4-dihydroxy-6-(3'-hydroxy-4'-methoxy-E-styryl)-2-pyron-3-O- β -glucopyranosid identifiziert werden.

Die unterschiedlichen Verschiebungen von 3'-Dehydroxyequisetumpyron und *p*-Methoxyequisetumpyron im Vergleich mit Equisetumpyron (siehe Tabelle 3.1-2 und Tabelle 3.1-3) beruhten wahrscheinlich auf Lösungsmiteleinflüssen. Bei der Strukturaufklärung von Equisetumpyron war aufgefallen, dass sich insbesondere die Signale von C-2, C-4, C-5 und C-1'' sowie H-5 und H-1'' mit Lagerung der Probe verschieben können (VEIT, nicht publizierte Ergebnisse). In Tabelle 3.1-1 sind die Verschiebungen zusammengefasst, die mit unterschiedlich alten Proben erhalten wurden. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank in $(CD_3)_2SO$. Mit zunehmender Lagerungsdauer erhöhte sich der Wassergehalt der Proben, was im Protonenspektrum gut sichtbar war. Die beobachteten Veränderungen, ins hohe Feld verschobenen ^{13}C -Signale und ins tiefe Feld verschobenen 1H -Signale, könnten daher durch den unterschiedlichen Wassergehalt der Proben bedingt sein. Berücksichtigen muss man, dass inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken sicherlich die Lage des Tautomeren-Gleichgewichtes verschieben können (siehe Abbildung 3.1-2), was wiederum Einfluss auf die chemischen Verschiebungen hat. Auch möglicherweise nur katalytische Mengen von Verunreinigungen könnten sich auf die Einstellung dieses Gleichgewichtes auswirken. Insgesamt scheint das verwendete Lösungsmittel jedoch nur begrenzten Einfluss auf die Lage der chemischen Verschiebungen zu haben, was ein Vergleich der Daten von Equisetumpyron (in $(CD_3)_2SO$) und 5,6-Dehydrokawain (in $CDCl_3$) zeigt (siehe Tabelle 3.1-1).

Tabelle 3.1-1: Chemische Verschiebungen [ppm] von Equisetumpyron in $(CD_3)_2SO$ in Abhängigkeit von der Lagerzeit der Probe bei 10°C. *publizierte Daten (VEIT *et al.* 1993B).

Messzeitpunkt der Probe		10.1.1992	24.1.1992	9.3.1992	27.4.1992*
^{13}C [ppm]	C-2	161.2			160.5
	C-4	168.1			162.4
	C-5	106.0			103.5
	C-1''	106.0			104.2
1H [ppm]	H-5	5.95	5.96	6.10	6.10
	H-1''	4.46	4.45	4.58	4.67

Ergebnisse

Tabelle 3.1-2: ^1H , ^{13}C -NMR-Daten von 3-Desoxy-Equisetumpyron, 5,6-Dehydrokawain und *p*-Cumarsäure. J = Kopplungskonstante; * Fernkopplung optimiert auf 8 Hz; Multiplizitäten: m = Multiplett, s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett. ¹⁾ (BANERJI *et al.* 1980) ²⁾ GEIGER, H. SAARBRÜCKEN, nicht publizierte Daten.

	3-Desoxy-Equisetumpyron		5,6-Dehydrokawain ¹⁾		<i>p</i> -Cumarsäure ²⁾
	^{13}C [ppm]	^1H [ppm] (J[Hz])	Korrelation von ^{13}C zu ^1H *	^{13}C [ppm]	Korrelation von ^{13}C zu ^1H *
4-OCH ₃				55.5	
2	162.2 s			163.2	
3	124.0 s		H-5, H-1''	88.7	H-3, H-5
4	168.7 s		(H-5)	170.8	
5	107.6 d	5.89 s	H-8'	100.8	H-3, H-5, H-7
6	154.1 s		H-7', H-8', H-5	158.6	
1'	126.8 s		H-3', H-5', H-8	135.3	H-3', H-5', H-
2'	128.7 d	7.41 d (8.3)	H-2', H-6', H-7	127.2	H-2'
3'	115.8 d	6.76 d (8.1)	H-3', H-5'	128.6	H-3', H-5'
4'	158.3 s		H-2', H-6'	129.1	
5'	115.8 d	6.76 d (8.1)	H-3', H-5'	128.6	
6'	128.7 d	7.41 d (8.3)	H-2', H-6'	127.2	
7' (α)	131.9 d	6.94 d (16.0)	H-2', H-6'	135.5	
8* (β)	117.4 d	6.61 d (16.0)	(H-5)	118.8	H-7
1''	107.1 d	4.38 d (6.3)			
2''	73.7 d	3.18-3.09 m			
3''	76.4 d	3.50-3.46 m			
4''	69.9 d	3.74-3.71 m			
5''	77.0 d	3.18-3.09 m			
6''	61.0 t	3.74-3.71 m			
Lösungsmittel	(CD ₃) ₂ SO			CDCl ₃	

Ergebnisse

Tabelle 3.1-3: ^1H und ^{13}C -NMR-Daten von 4-Methoxy-Equisetumpyron, Equisetumpyron, 4-Methoxyhispidin und Hispidin. J-Kopplungskonstante; * Fernkopplung auf 8 Hz; + verbreitertes Signal; Multiplizitäten: m: = Multiplett, s = Singulett, d = Duplett, t = Triplet, q = Quadruplett ¹⁾ (VEIT *et al.* 1993B) ²⁾ (ADAM *et al.* 1994).

	4-Methoxyequisetumpyron		Equisetumpyron ¹⁾		4-Methoxyhispidin ²⁾		Hispidin ²⁾	
	^{13}C [ppm]	^1H [ppm] J [Hz]	Korrelation von ^{13}C zu ^1H	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	Korrelation von ^{13}C zu ^1H	^{13}C s [ppm]	^1H [ppm]
4-OCH ₃								
2	162.2 s		H-5, H-1''	160.5 s			167.7 s	
3	124.0 s		(H-5)	122.7 s		H-5, H-1''	90.3 d	5.37 d
4	168.7 s			162.4#s		H-5	173.3 s	
5	108.0 d	5.93 s	H-8'	103.5+d	6.10 s	H-8'	101.7 d	6.07 d
6	153.9 s		H-7', H-8', H-5	154.6 s		H-7', H-8', H-5	161.9 s	
1'	128.8 s		H-5', H-7', H-8'	127.1 s		H-5', H-7', H-8'	128.7 s	
2'	113.4 d	7.00 d (2.0)	H-7', H-6''	113.9 d	6.99 d (2.1)	H-7', H-6''	114.8 d	7.01 d
3'	146.7 s		H-2', H-5'	145.5 s		H-2', H-5'	146.6 s	
4'	148.6 s		H-2', H-5', H-6'	146.9 s		H-2', H-5', H-6'	148.6 s	
5'	112.2 d	6.90 d (8.6)		115.7 d	6.74 d (8.1)	H-6'	116.5 d	6.75 d
6'	119.5 d	6.99 dd (2.0, 8.6)	H-2', H-7', H-8'	119.9 d	6.90 dd (8.3, 2.1)	H-2', H-5', H-7', H-8'	122.0 d	6.89 dd
7'(α)	131.4 d	6.94 d (16.0)	H-2', H-6'	132.9 d	6.98 d (16.3)	H-2', H-6', H-8'	137.2 d	7.25 d
8'(β)	118.3 d	6.58 d (16.0)	H-5	116.4 d	6.60 d (16.0)	H-7', H-10'	116.8 d	6.53 d
1''		4.38 d (6.3)		104.2+d	4.67 d (6.7)	H-2''		
2''		3.18-3.09 m		73.7 d	3.19-3.14 m	H-3''		
3''		3.50-3.46 m		76.4 d	3.19-3.14 m	H-2'', H-5''		
4''		3.74-3.71 m		69.6 d	4.14-3.07 m	H-6''A, H-6''B, H-2''/3'', H-5''		
5''		3.17-3.09 m		77.2 d	3.14-3.07 m	H-4'', H-6''A, H-6''B		
6''		3.74-3.71 m		60.8 t	A 3.64 d (11.5, 1.7) B 3.45 d (11.7, 5.3)	H-5''		
4'-OCH ₃	55.7 q	3.77 s						
LM	(CD ₃) ₂ S			(CD ₃) ₂ SO			(CD ₃) ₂ SO	CD ₃ OD

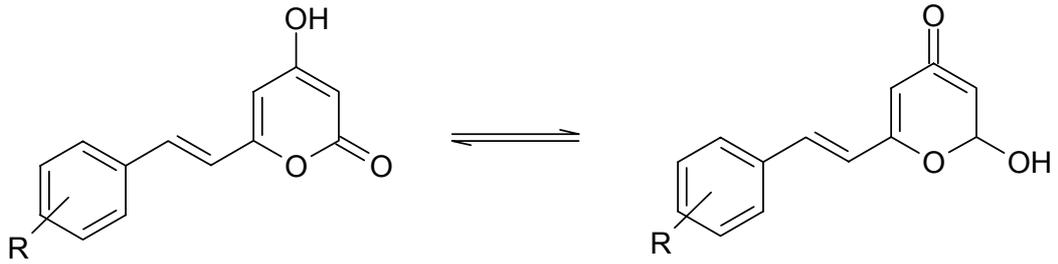


Abbildung 3.1-2: Tautomerisierung von Styrylpyronen.

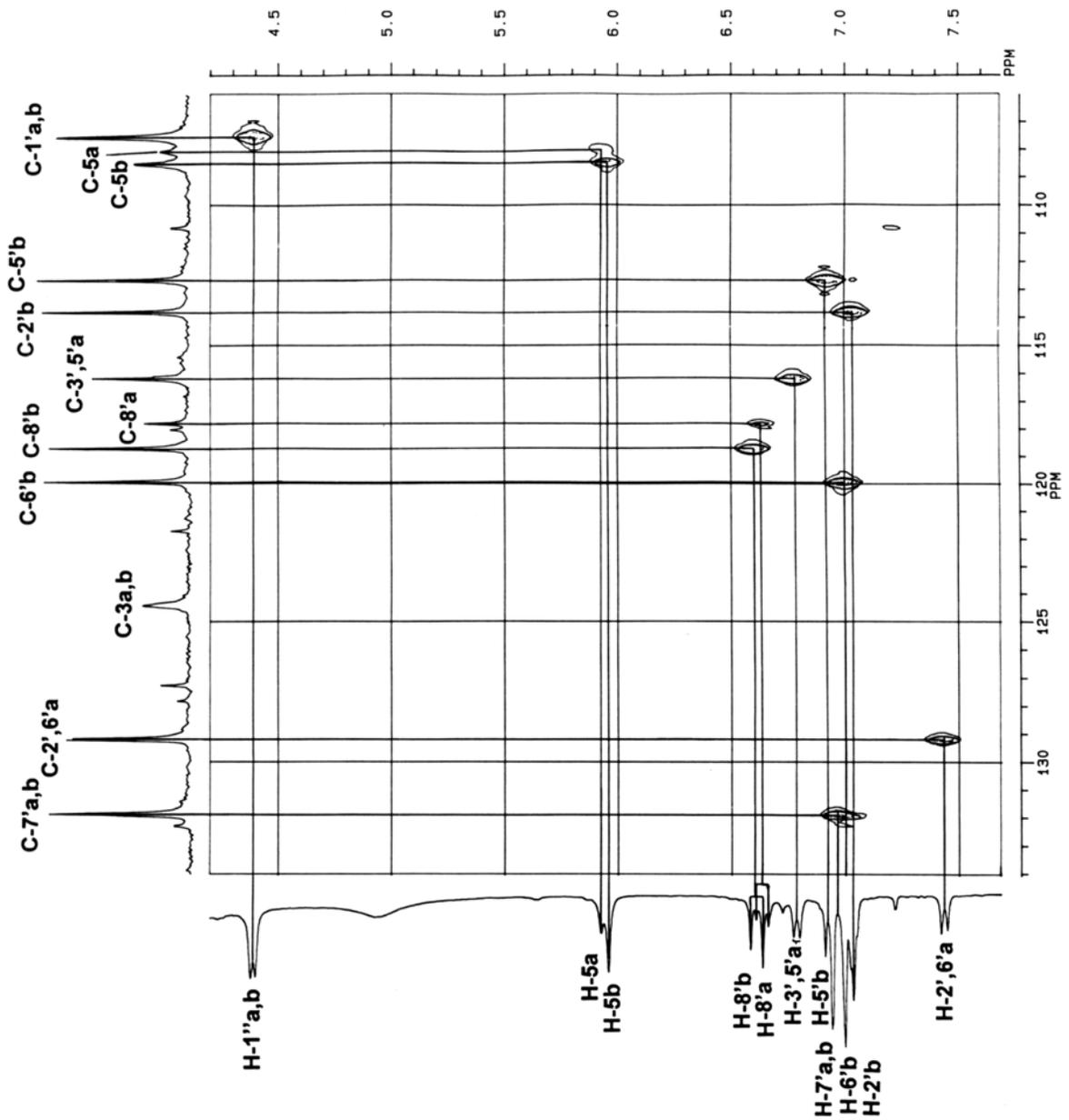


Abbildung 3.1-3: $^1\text{J}-^2\text{D}-^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -heterokorreliertes NMR-Spektrum der in Mischung vorliegenden Komponenten 1(a) und 2 (b).

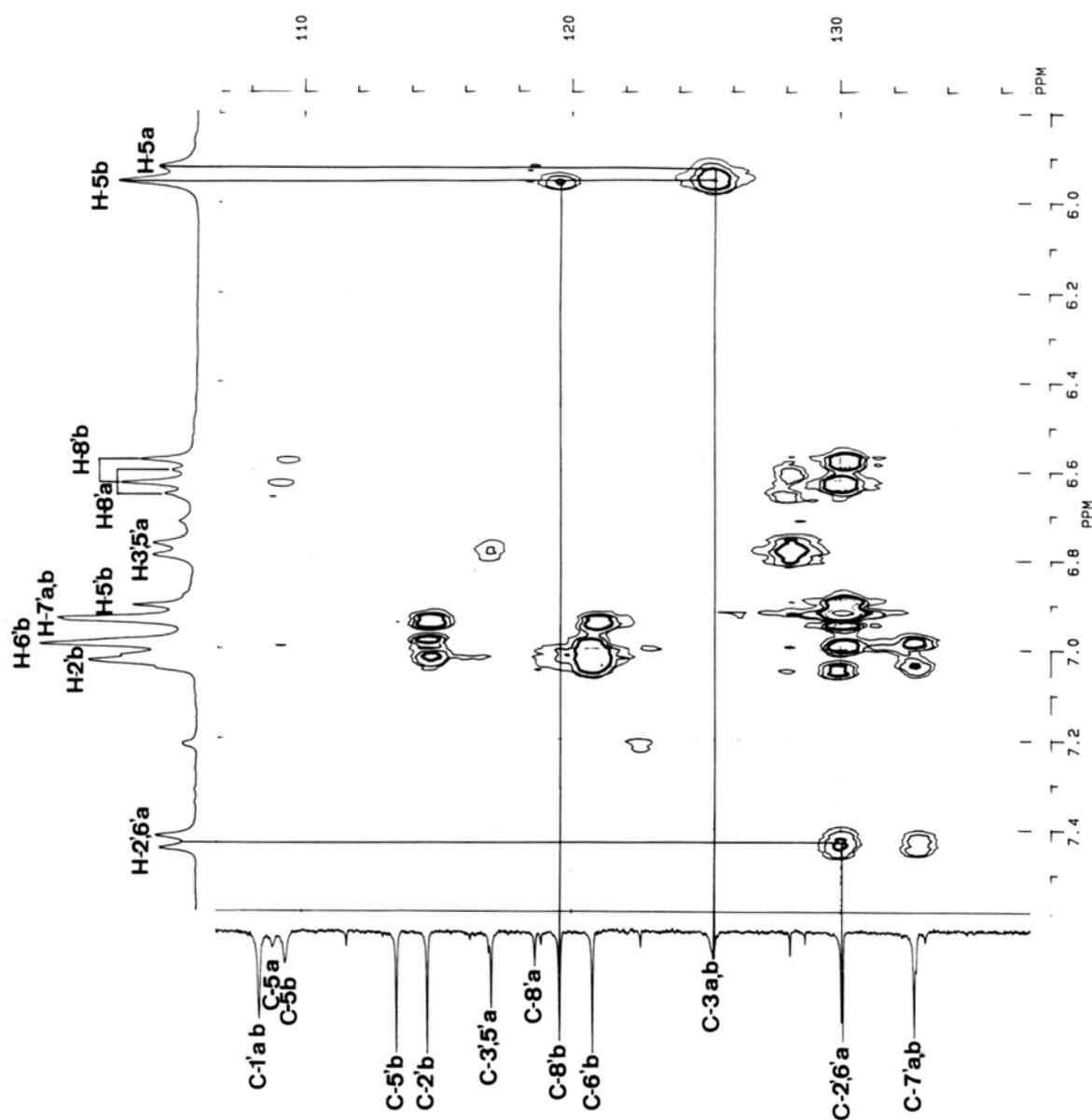


Abbildung 3.1-4: Ausschnitt aus dem $^3J\text{-}^2\text{D-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -heterokorrelierten NMR-Spektrum der in Mischung vorliegenden Komponenten 1(a) und 2 (b). Beispielhaft sind die Korrelationen von H-5 zu C-3 und C-8' sowie von H-2',6' (a) zu C-2',6' (a) eingezeichnet.

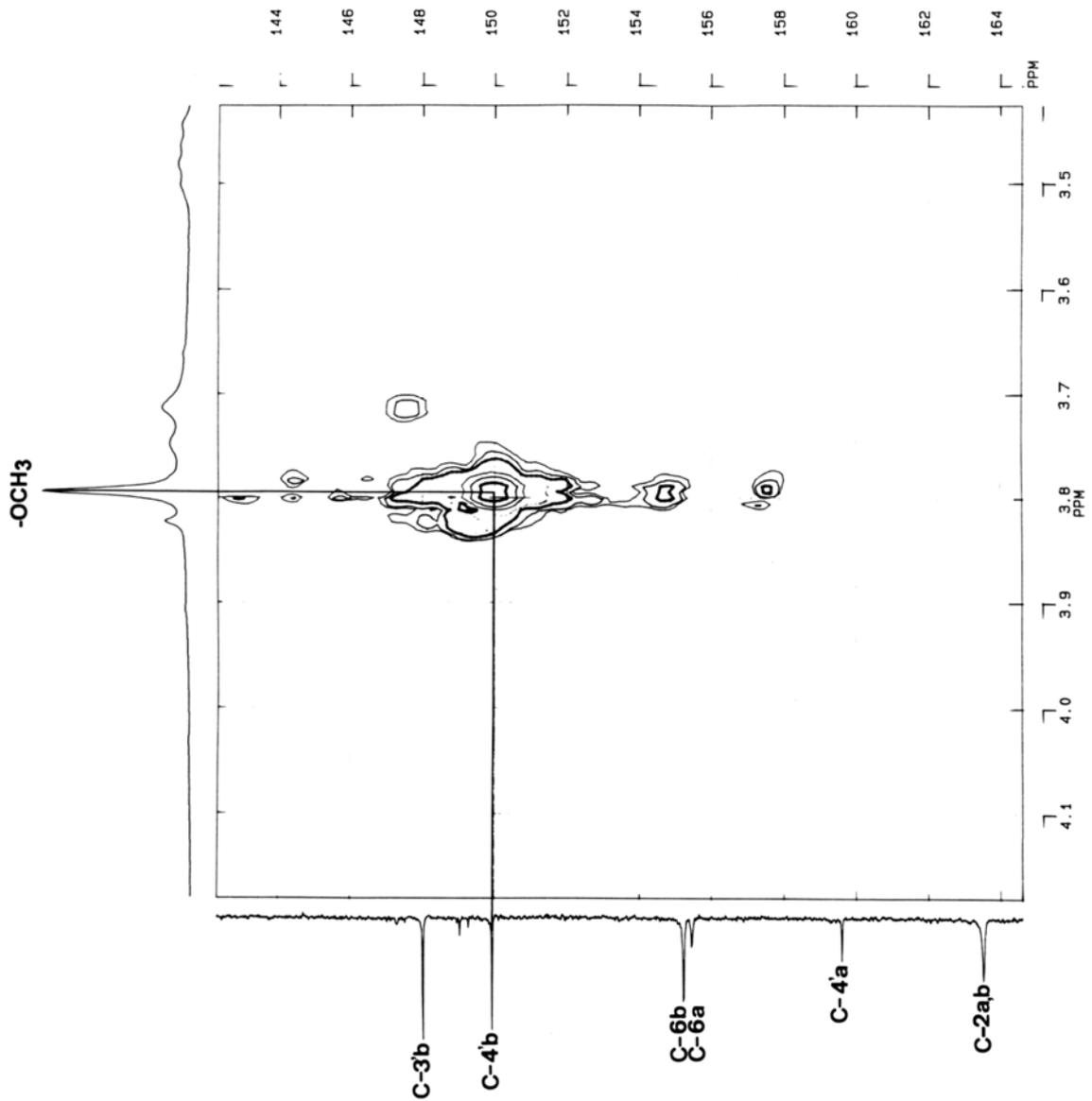


Abbildung 3.1-5: Ausschnitt aus dem $^3J\text{-}^2\text{D-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -heterokorrelierten NMR-Spektrum der in Mischung vorliegenden Komponenten 1 (a) und 2 (b). Die starke Korrelation der Methylprotonen zu 4' (b) ist deutlich sichtbar und belegt die Methylierung der OH-Gruppe in Position 4 in der Komponente 2.

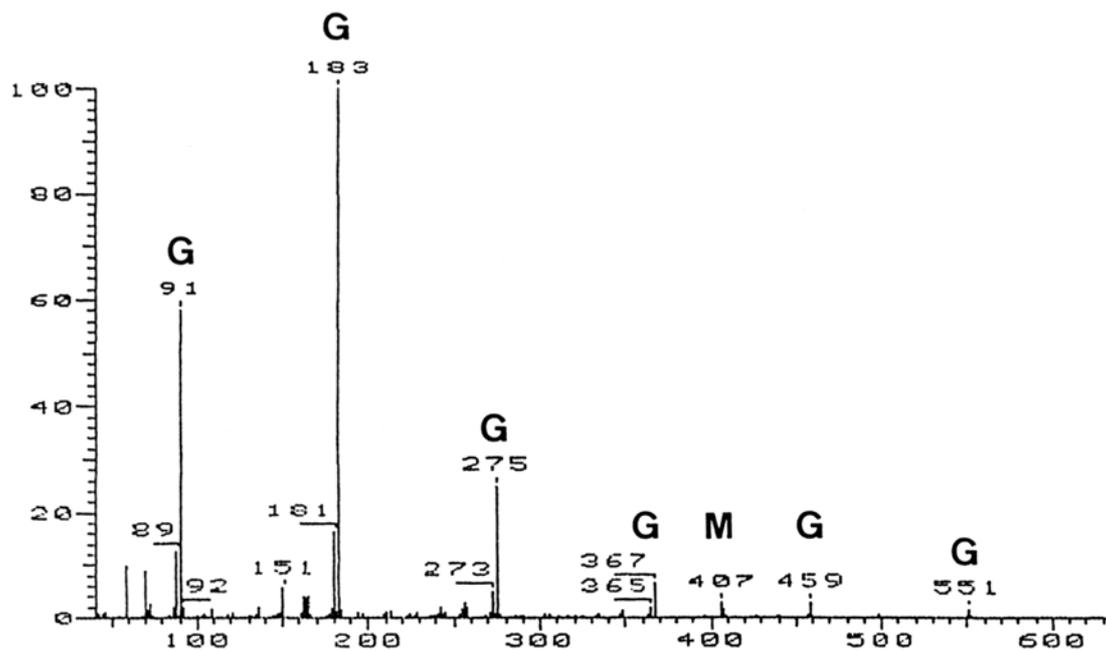


Abbildung 3.1-6: FAB-Massenspektrum (negativ) von 3'-Desoxyequisetumpyron (36); M=Molekülpeak, Matrixfragmente: G = Glycerin.

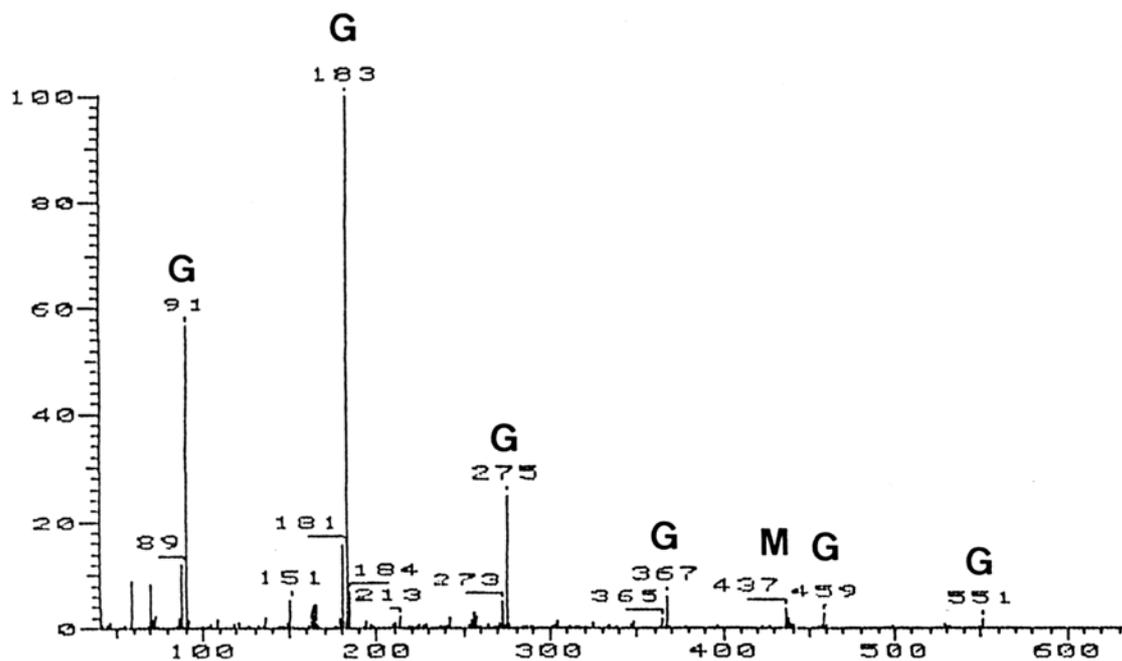


Abbildung 3.1-7: FAB-Massenspektrum (negativ) von *p*-Methoxyequisetumpyron (39); M = Molekülpeak, Matrixfragmente: G = Glycerin.

Equisetumpyron (25)

Bei Messungen von Equisetumpyron in DMSO-d₆ waren verschiedene Probleme aufgetreten (VEIT *et al.* 1993B):

- die Signale für C4, C5 und C1 waren stark verbreitert,
- die chemischen Verschiebungen im ¹H-Spektrum für H5 und H1'' veränderten sich in Abhängigkeit von der Lagerung der Probe (bis 0.21 ppm) für das anomere Proton,
- die chemischen Verschiebungen im ¹³C-Spektrum für C2, C4, C5 und C1'' änderten sich ebenfalls mit Lagerung der Probe; hier war eine Verschiebung ins hohe Feld zu beobachten (bis 5.7 ppm für C4).

Diese Effekte könnten mit dem Tautomerengleichgewicht von Equisetumpyron in Lösung zusammenhängen, was zu Signalverbreiterungen führen kann. Oder durch die unterschiedliche Protonenaustauschgeschwindigkeit bedingt gewesen sein, die in DMSO sehr stark vom Wassergehalt abhängig ist. Mit zunehmender Lagerung nahm der Wassergehalt aufgrund der Hygroskopie der Lösungsmittels zu, was zu einem hochfeldverschobenem Signal für H5 führte. Den umgekehrten Effekt beobachtet man für H1'', dessen Signal ins tiefe Feld verschoben erschien. Um solche Schwierigkeiten zu vermeiden, wurde eine Probe von Equisetumpyron in CD₃OD (Deuterium-Methanol) vermessen. Die chemischen Verschiebungen waren von denen, die in DMSO-d₆ erhalten worden waren, leicht unterschiedlich (siehe Tabelle 3.1-4). Im ¹³C-Spektrum ergaben alle Atome deutliche Signale, Signalverbreiterungen waren nicht zu beobachten. Die Zuordnungen für die Signale aus VEIT *et al.* 1993B konnten mit Hilfe 2D¹H-¹³C-heterokorrelierten NMR-Spektren bestätigt werden. Gleiches gilt für die NOE-Experimente. Alle Daten bestätigten die Anknüpfung einer β-D-Glucose an C-3 über eine O-glycosidische Bindung. Damit ist die Grundlage für kernresonanzspektroskopische Untersuchungen weiterer, bisher unbekannter Styrylpyrone gelegt, die anhand dieser Vergleichsdaten zukünftige Messungen in CD₃OD ermöglichen.

Ergebnisse

Tabelle 3.1-4: Vergleich der chemischen Verschiebungen δ [ppm] von Equisetumpyron in verschiedenen Lösungsmitteln. *) = Zuordnungen mit gleichen chemischen Verschiebungen sind austauschbar; +) = verbreitertes Signal; ++) = stark verbreitertes Signal. Multiplizitäten: s = Singulett, d = Duplett, m = Multipllett, t = Triplett, bei ^{13}C ermittelt mit DEPT-Technik; Kopplungskonstanten J [Hz] in Klammern.

C-Atom	DMSO-d ₆		CD ₃ OD	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	160.5 s		163.6 s	
3	127.7 s		124.1 s	
4	162.4 s ++)		164.0 s	
5	103.5 d +)	6.1 s	102.6 d	6.20 s
6	154.6 s		158.1 s	
1'	127.1 s		129.0 s	
2'	113.9 d	6.99 d (2.1)	114.7 d	7.05 d (8.3)
3'	145.5 s		146.7 s	
4'	146.9 s		148.5 s	
5'	115.7 d	6.74 d (8.1)	116.6 d *)	6.80 d (8.1)
6'	119.9 d	6.90 dd (8.3, 2.1)	121.8 d	6.96 d (8.3)
7' (α)	132.9 d	6.98 d (16.3)	136.5 d	7.25 d (16.0)
8' (β)	116.4 d	6.60 d (16.0)	166.6 d *)	6.59 d (16.0)
1''	104.2 d	4.67 d (6.7)	106.1 d	4.81 d (6.3)
2''	73.7 d	3.19-3.14 m	75.7 d	3.35-3.45 m
3''	76.4 d	3.19-3.14 m	77.6 d	3.40-3.45 m
4''	69.6 d	3.14-3.07 m	70.8 d	3.35-3.45 m
5''	77.2 d	3.14-3.07 m	78.5 d	3.35 m
6''	60.8 t A	3.64 d (11.5, 1.7)	62.2 t	3.86 (12.0, 2.2)
	B	3.45 d (11.7, 5.3)		3.75 (11.9, 4.5)

Pyron 12 (11)

Eine unbekannte, als Pyron 12 bezeichnete Komponente wurde aus Rhizomen von *Equisetum hyemale* L. isoliert (siehe Abschnitt 2.4.5) und in ihrer Struktur aufgeklärt. Die isolierte Menge (7 mg) reichte für umfassende kernresonanzspektroskopische Experimente nicht aus. Es ließen sich jedoch wichtige Informationen aus dem ^1H -NMR- sowie aus den FAB-MS-Spektren ableiten. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte deutliche Verunreinigungen im Aliphatenbereich und nur undeutliche Signale für den Aromaten- und Pyronteil des Moleküls. Zwei Signale, wie sie für anomere Protonen typisch sind, waren sichtbar (siehe Abbildung 3.1-8 A). Eines bei 4.51 ppm ($J = 7.8$ Hz) und eines bei 5.15 ppm ($J = 3.6$ Hz). Betrachtet man publizierte Daten für glycosidische Disaccaride von Flavonoiden (MARKHAM 1994, VEIT *et al.* 1993A), so waren diese chemischen Verschiebungen typisch für einen $-\text{O}-(2\text{G}-\text{O}-\beta\text{-D-glucosyl})-\beta\text{-D-Glucose}$ Rest (Sophorosid) (siehe Abbildung 3.1-9).

Ergebnisse

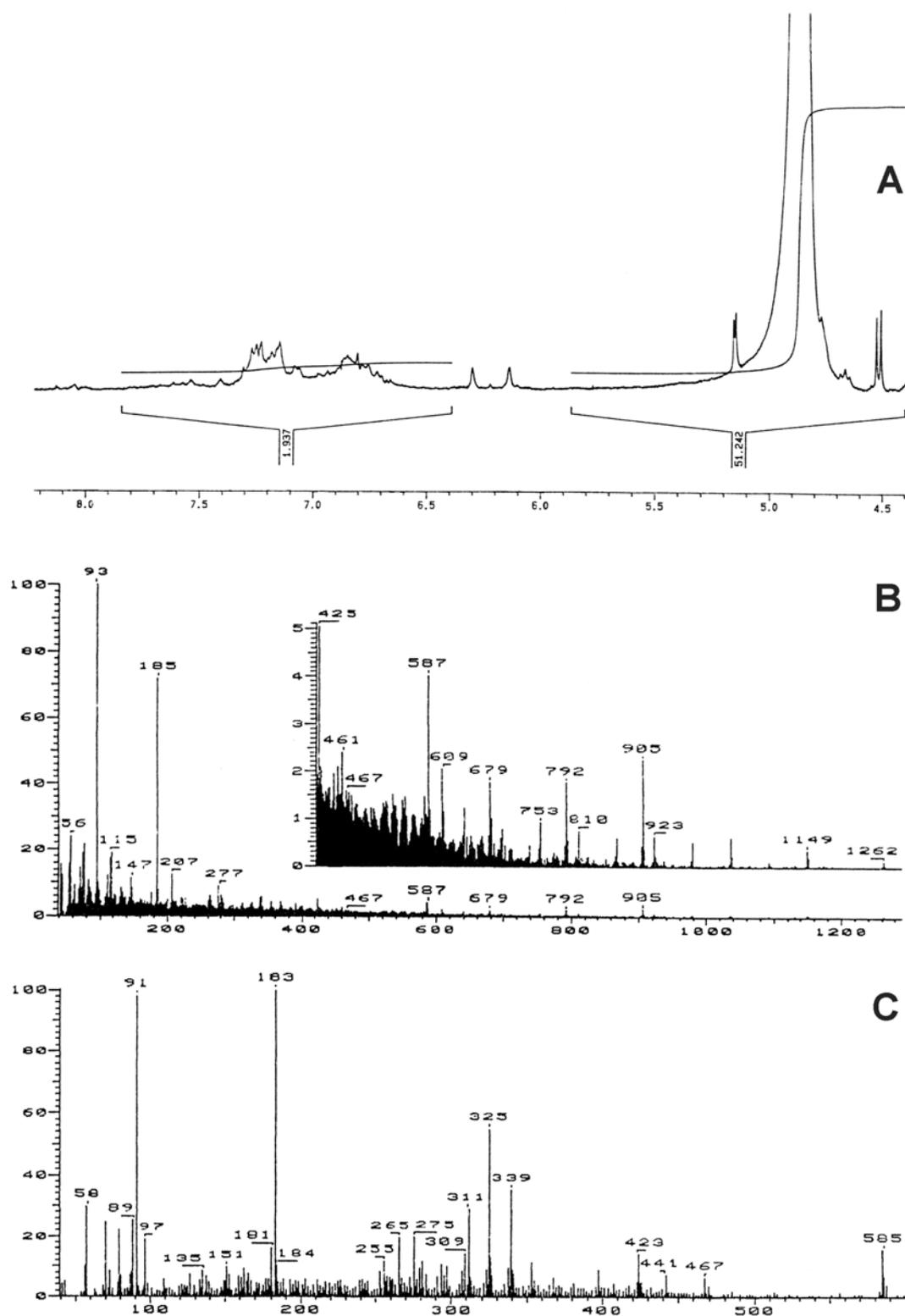


Abbildung 3.1-8: NMR- und MS-Spektren von Komponente Pyron 12. A Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum; FAB-Massenspektren, B positiv, C negativ; vergleiche auch Tabelle 3.1-5 und Abbildung 3.1-9.

Ergebnisse

Das Vorliegen eines Pyrons mit glykosidisch gebundenen Glucoseeinheiten an unterschiedlichen Stellen des Moleküls konnte nicht sicher ausgeschlossen werden. Dies war jedoch unwahrscheinlich, da eine Verschiebung von 4.51 ppm für anomere Protonen in Nachbarschaft phenolischer Aglycone zu niedrig erschien. Das Vorliegen eines Pyronglycosides wurde auch durch die massenspektroskopischen Daten gestützt (siehe Tabelle 3.1-5). Danach handelte es sich bei dem Aglycon mit großer Wahrscheinlichkeit um 3-Hydroxyhispidin, mit zwei Glucoseeinheiten verknüpft ergibt sich ein Molekulargewicht von 586, was der Massenzahl von $[M+H]^+ = m/z$ 587 und damit dem Molekülion im FAB-Massenspektrum der Abbildung 3.1-8 bzw. der Massenzahl von $[M-H]^- = m/z$ 585 und damit dem Molekülion im FAB-MS-Spektrum der Abbildung 3.1-8 entsprach. Das Fragment $m/z = 325$ könnte aus einer Spaltung entsprechend in Abbildung 3.1-8 dargestellt resultieren, was ein weiteres Argument für das Vorliegen eines Sophorosides wäre. Grüne Sporophyten von *Equisetum*-Arten akkumulieren Flavonoid-Sophoroside (VEIT *et al.* 1995B). Die Pflanzen besitzen demnach die biosynthetische Möglichkeit solche Disaccaridglykoside zu bilden. Ein endgültiger Beweis für die Struktur kann jedoch durch 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ausreichender Mengen der Substanz geführt werden.

Tabelle 3.1-5: FAB-MS-Fragmente von Pyron 12 in Glycerolmatrix = Gly, Hi = Hispidin, EP = Equisetumpyron, M = Molekülion.

m/z	Positiv (Abbildung 3.1-8 B)	m/z	Negativ (Abbildung 3.1-8 C)
425	$[EP+H]^+$	424	$[EP-H]^-$
587	$[M+H]^+$	585	$[M-H]^-$
609	$[EP+2Gly+H]^+$	339	$[Hi+Gly-H]^-$
679	$[M+Gly+H]^+$	91	$[Gly-H]^-$
792	$[M+Gly+Na]^+$	183	$[2Gly-H]^-$
93	$[Gly+H]^+$	275	$[3Gly-H]^-$
185	$[2Gly+H]^+$		
207	$[2Gly+Na]^+$		
277	$[3Gly+H]^+$		

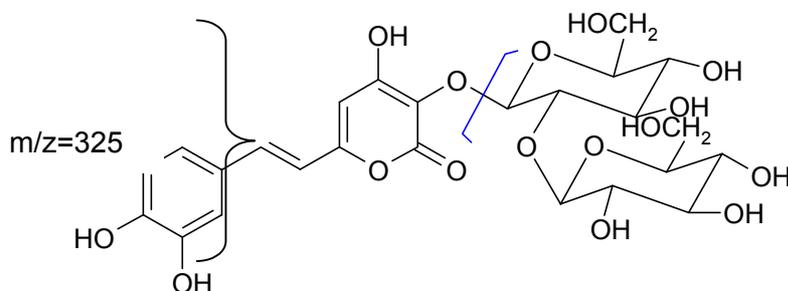


Abbildung 3.1-9: Mögliche Struktur der Komponente Pyron 12, mit Darstellung des vermuteten Fragmentes $m/z = 325$ des FAB-MS-Spektrums (negativ); siehe auch Abbildung 3.1-8.

3.2 Phenolische Inhaltsstoffe der sporophytischen Gewebe

Bisherige Untersuchungen von Sporophyten verschiedener Arten des Subgenus *Equisetum* beschränkten sich auf die oberirdischen Teile der Pflanzen. Aufgrund zahlreicher Daten zur Akkumulation phenolischer Komponenten, insbesondere von Flavonoidglykosiden, konnten die Arten taxonomisch klassifiziert werden. Eine Einteilung der Arten in Sektionen, wie sie anhand morphologischer Merkmale von PAGE (PAGE 1982) erfolgte, wurde damit bestätigt (VEIT *et al.* 1995B). Flavonoidmuster steriler oberirdischer Triebe, wie sie sich in Chromatogrammen methanolischer Extrakte darstellen, können als Fingerabdruck einer Art angesehen werden (VEIT *et al.* 1995B). Es wurde untersucht ob sich die Verwandtschaftsbeziehungen auf phytochemischer Ebene in Rhizomen ebenso nachzeichnen lassen bzw. ob es arttypische Muster phenolischer Komponenten in diesen Organen gibt und inwieweit das Spektrum der Styrylpyrone, die in Rhizomen von *E. arvense* gefunden wurden, durch Untersuchung anderer Arten erweitert wird.

An Pflanzen von Topfkulturen verschiedener geographischer Herkünfte wurden Rhizome sämtlicher Arten des Subgenus *Equisetum*, von *E. arvense* zusätzlich andere unterirdisch vorkommende Organe bzw. Gewebe wie Speicherknöllchen, Rhizomspitzen, Adventivwurzeln sowie Sprossabschnitte des Übergangsbereiches Rhizom zu oberirdischer Spross untersucht.

3.2.1 Muster der phenolischen Inhaltsstoffe in Rhizomen von *Equisetum arvense* L.

Abbildung 3.2-6 zeigt ein typisches Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus einem Rhizom von *E. arvense*. Generell erfolgte die Peakzuordnung durch Vergleich der absoluten und relativen Retentionszeiten sowie durch Vergleich der *on-line*-UV-Spektren von Komponenten aus Referenzchromatogrammen. Meist war keine Zuordnung der Peaks zu bekannten Substanzen möglich, *on-line* UV-Spektren erlaubten in der Regel die Zuordnung zu einem chemischen Grundkörper und damit zu einer Stoffgruppe. Styrylpyrone weisen charakteristische UV-Spektren mit Maxima im Bereich von 253-258 nm und 355-373 nm auf, Kaffeesäurederivate zeigen Maxima im Bereich von 330 nm (Angaben der *on-line* UV-Maxima aller detektierten Komponenten siehe Tabelle 7.1-1 im Anhang). Rhizome von *E. arvense* akkumulieren Verbindungen der beiden Stoffgruppen Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate. In den analysierten Proben überwogen quantitativ die Styrylpyrone, wobei Equisetumpyron (**25**) (vgl. Abbildung 3.2-6) stets als Hauptkomponente detektiert wurde. Daneben traten regelmäßig sechs weitere Styrylpyranderivate auf. Die beiden strukturaufgeklärten Verbindungen 3'-Dehydroxy-Equisetumpyron (**36**) und *p*-Methoxyequisetumpyron (**39**) in höherer Konzentration und die mit Pyron 12 (**11**), Pyron 1 (**31**), Pyron 3 (**37**) und Pyron 5 (**41**) bezeichneten Substanzen, die häufig nur in Spuren detektierbar waren.

Bekanntere Verbindungen der Hydroxyzimtsäurederivate sind die Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure (**50**) und die Monokaffeoyl-*meso*-weinsäure (**10**). Weitere typische Hydroxyzimt-

säurederivate, die in Rhizomen von *E. arvense* detektiert wurden, sind die als C2 bezeichnete Komponente (**24**) sowie die Säuren H2 (**2**), H3 (**3**), H6 (**9**), H8 (**16**), H10 (**18**), H12 (**23**) und H16 (**35**). Komponente H6 (**9**) ist interessant, weil das zugehörige *on-line* UV-Spektrum mit einem Maximum bei 313 nm auf ein Derivat der *p*-Cumarsäure schließen lässt. Die anderen aufgezählten Hydroxyzimtsäurederivate leiten sich offensichtlich von der Kaffeesäure ab, da sie entsprechende UV-Spektren besitzen (vgl. Tabelle 7.1-1 im Anhang).

Akkumulationsdynamik

Um die Ergebnisse zur interspezifischen Variation der Inhaltsstoffmuster verschiedener Arten beurteilen zu können, sind Kenntnisse über Änderungen der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe im Jahresverlauf notwendig. Frühere Arbeiten zeigten Änderungen der Inhaltsstoffmuster im Jahresverlauf von sterilen oberirdischen Sprossen verschiedener Arten der Gattung *Equisetum* (VEIT *et al.* 1991A). Dabei wurden Schwankungen des Flavonoide und Hydroxyzimtsäuregehalts während der Vegetationsperiode festgestellt. Der Flavonoidgesamtgehalt war in aufeinanderfolgenden Jahren unterschiedlich und daher offenbar durch Umwelteinflüsse bestimmt. Veränderungen der relativen Gehalte der Hydroxyzimtsäurederivate und der Flavonoide hingegen hatten in mehreren Untersuchungsjahren identische Verläufe und wurden deshalb als metabolische Prozesse interpretiert.

Eine jahreszeitabhängige Schwankung der Akkumulation von Inhaltsstoffen in Rhizomen wurde an einer Pflanze von *E. arvense* (Topfkultur, Herkunftsgebiet Bochum) untersucht. Geerntet wurden Proben im Frühjahr, kurz nach Austrieb der Sporophyten, zu zwei weiteren Zeitpunkten im Sommer und im Herbst nach Anlage der fertilen Triebe für die kommenden Vegetationsperiode. Die Muster der Styrylpyrone zeigten dabei ein relativ einheitliches Bild. Die Anteile der einzelnen Pyrone bezogen auf den Pyrongesamtgehalt der Proben sind in Abbildung 3.2-1 dargestellt. Der Anteil von Equisetumpyron (**25**) war in der Probe, die im Juli geerntet wurde mit 70 % leicht erhöht, lag sonst jedoch im Bereich von 50-59 %. Die anderen Styrylpyrinderivate konnten zu jedem Untersuchungszeitpunkt in vergleichbaren Gehalten und relativen Anteilen detektiert werden. In den untersuchten Proben nahm der absolute Gehalt der Pyrone im Laufe des Jahres ab (Abbildung 3.2-2). Im Akkumulationsmuster der Hydroxyzimtsäurederivate ließen sich in den untersuchten Proben deutliche Schwankungen feststellen. In den Proben der ersten Hälfte der Vegetationsperiode dominierte die Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure, wies aber in den Proben der zweiten Jahreshälfte einen deutlichen geringeren absoluten Gehalt auf (Abbildung 3.2-2). Auch die Monokaffeoyl-*meso*-weinsäure zeigte im Frühjahr einen höheren absoluten Gehalt. Beide Säuren konnten in allen Analysen detektiert werden. Die anderen Hydroxyzimtsäurederivate zeigten keine Tendenzen (siehe Tabelle 7.1-3 im Anhang). Der Gesamtgehalt an Hydroxyzimtsäurederivaten nahm im Verlauf des Jahres in den untersuchten Proben auf weniger als die Hälfte des Gehaltes der Frühjahresprobe ab (Abbildung 3.2-2). Die relativen Anteile beider Stoffgruppen am Gesamtphenolgehalt zeigten eine geringe Schwankung (ohne Abbildung).

Ergebnisse

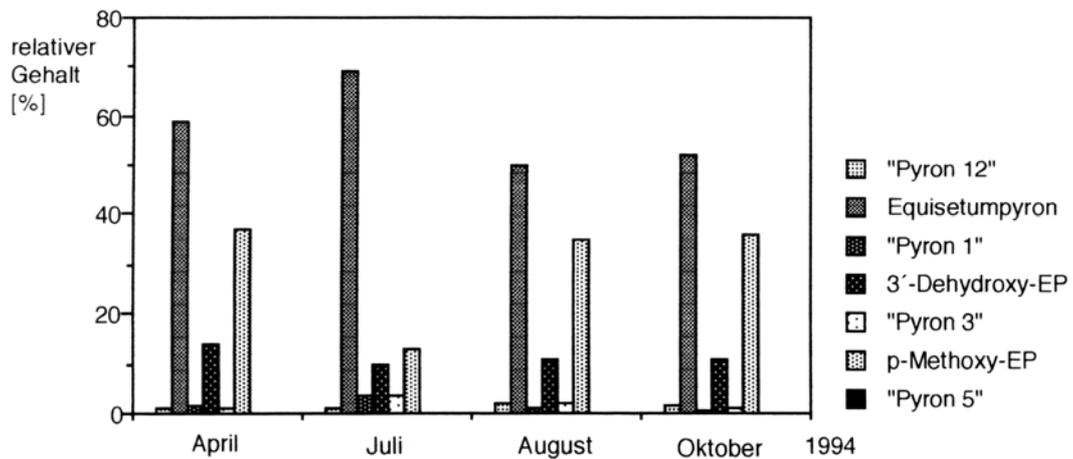


Abbildung 3.2-1: Relative Anteile [%] von Styrylpyronen am Pyrongesamtgehalt in Rhizomen von *Equisetum arvense* L. zu verschiedenen Erntezeitpunkten des Jahres 1994; EP = Equisetumpyron.

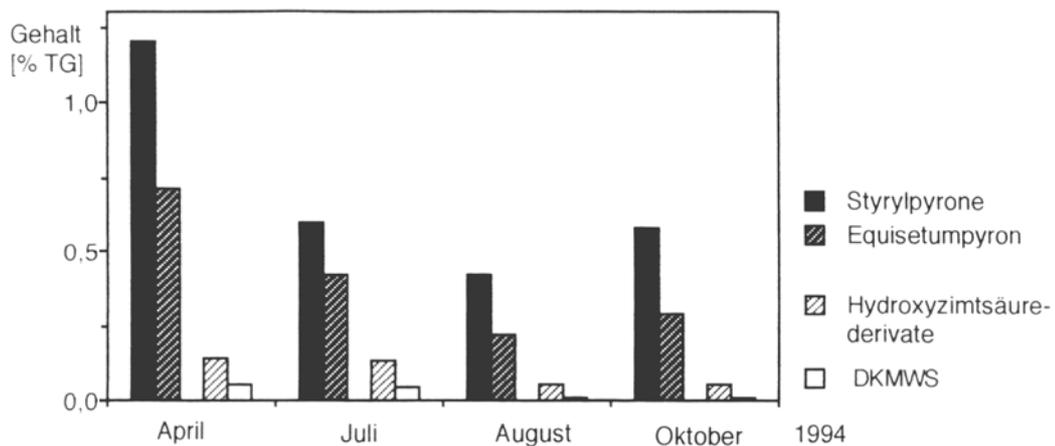


Abbildung 3.2-2: Absolute Gehalte [%TG] von Styrylpyronen und Hydroxycinnamsäurederivaten in Rhizomen von *Equisetum arvense* L. zu verschiedenen Erntezeitpunkten des Jahres 1994; DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure.

Intraspezifische Variation

Intraspezifische Variationen der Inhaltsstoffmuster wurden an mehreren Pflanzen von *E. arvense* verschiedener Herkünfte (Topfkulturen) und zwei Pflanzen von verschiedenen Standorten des Botanischen Gartens der Universität Würzburg untersucht. In allen Proben zeigten die Muster phenolischer Inhaltsstoffe weitgehende Übereinstimmung. Dies betraf auch die Analyse der Proben von *E. arvense* mit japanischer Herkunft. Von *E. arvense* existieren zwei Chemodeme, die distinkte geographische Areale besiedeln (VEIT *et al.* 1990B). Arten des Chemodems, deren Vertreter in Nordamerika und Asien verbreitet sind, enthalten im Gegensatz zu europäischen Pflanzen in sterilen Sprossen die Flavonoide Luteolin-5-O-glucosid und Luteloin-O-(6''-O-malonylglucosid) als Hauptkomponenten. Durchschnittliche Gehalte von Styrylpyronen und Hydroxyzimtsäurederivaten verschiedener Proben sind in Tabelle 3.2-1 aufgeführt.

Tabelle 3.2-1: Durchschnittliche Gehalte (n = 11) phenolischer Komponenten in Rhizomen von *Equisetum arvense* L.. HZS = Hydroxyzimtsäurederivate; EP = Equisetumpyron; DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure; Py = Summe der Gehalte von Pyron12 (**11**), Pyron1 (**31**), Pyron3 (**37**) und Pyron5 (**41**). Vgl. Tabelle 7.1-2 im Anhang, die Proben die dieser Berechnung zugrunde liegen sind dort mit (*) gekennzeichnet.

Komponente, Stoffgruppe	Mittelwert	Schwankung	Standard-abweichung
absolute Gehalte [% TG]			
Gesamtgehalt Pyrone	0,49	± 0,08	0,056
Gesamtgehalt HZS	0,08	± 0,04	0,27
Gesamtgehalt Phenole	0,54	± 0,10	0,081
Quotienten relative Gehalte [%]			
Equisetumpyron / Gesamtgehalt Pyrone	58	± 8	7,4
p-Methoxy-EP / Gesamtgehalt Pyrone	28	± 10	7,8
3'-Dehydroxy-EP / Gesamtgehalt Pyrone	12	± 2	1,7
Py / Gesamtgehalt Pyrone	6	± 1	0,6
DKMWS / Gesamtgehalt HZS	25	± 20	14
HZS / Gesamtgehalt Phenole	14	± 4	2,9

Gewebe- und entwicklungsspezifische Variationen im Inhaltsstoffmuster

Verschiedene Gewebe der unterirdische wachsenden Organe wurden getrennt untersucht, um mögliche Unterschiede der Inhaltsstoffmuster zu denen der Rhizome festzustellen. Als morphologische Besonderheit zeigen manche Arten der Equiseten in Speicherknöllchen umgewandelte Kurzsprosse der Rhizome. Diese sowie Adventivwurzeln der Rhizome wurden separat analysiert. Mit der Analyse der apikalen Sprossbereiche der Rhizome wurde die Akkumulation der Inhaltsstoffe abhängig vom Entwicklungsstadium des Gewebes untersucht. Rhizome zeigen ein völlig anderes Inhaltsstoffmuster als oberirdische Triebe. Der Wechsel des Musters beim Übergang des Sprosses von unterirdisch wachsendem Rhizom zu photosynthetisch aktivem Spross wurde durch die Analyse einzelner Internodien dieses Sprossabschnittes nachvollzogen.

Speicherknöllchen

Der qualitative Vergleich der Inhaltsstoffmuster von zwei Proben zeigte eine Übereinstimmung mit den jeweiligen Mustern der Rhizome (vgl. Tabelle 7.1-2 und 7.1-3 im Anhang). Der Gesamtgehalt beider Stoffgruppen lag jedoch deutlich unter dem der Rhizome. Durchschnittlich wurde in Knöllchen etwas weniger als die Hälfte des Gesamtgehaltes an Phenolen, verglichen mit Rhizomen berechnet. Die Unterschiede lassen sich durch das höhere relative Trockengewicht (Bezugsgröße der Berechnung) der Knöllchen erklären, die sich vor allem aufgrund der unterschiedlichen Stärkespeicherung in den Geweben ergeben (siehe Tabelle 3.2-2).

Rhizomspitzen

Die jungen Gewebe der Apikalbereiche unterschieden sich optisch von älteren Rhizomen durch die noch nicht ausgebildete Pigmentierung der epidermalen Schichten. Im mikroskopischen Bild (vgl. Abschnitt 3.3) zeigten sich diese Gewebe noch nicht völlig ausdifferenziert. Ebenfalls fehlte die Stärkespeicherung. Auch die Inhaltsstoffmuster ließen einige Besonderheiten erkennen. Untersucht wurden zwei Proben. Qualitativ zeigten die Pyronmuster weitgehende Übereinstimmung mit älteren Geweben der Rhizomen. Auffällig war der um ein mehrfaches höhere Gehalt im Vergleich zu dem in älteren Rhizomgeweben. Dies betraf beide Stoffgruppen (Tabelle 3.2-2).

Adventivwurzeln

Die Ergebnisse zeigten die gleichen Muster wie die der Rhizome, dies wurde für mehrere Arten festgestellt (siehe Tabelle 7.1-2 im Anhang).

Ergebnisse

Tabelle 3.2-2: Vergleich der absoluten und relativen Gehalte von Styrylpyronen und Hydroxyzimtsäurederivaten in verschiedenen Geweben zweier Pflanzen von *Equisetum arvense* L., EP = Equisetumpyron; HZS = Hydroxyzimtsäurederivate; MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt (vgl. Tabelle 7.1-2 im Anhang).

Pflanze Organ	<i>E. arvense</i> (Herkunft Bochum)			<i>E. arvense</i> (Herkunft Japan)		
	Knöllchen	Rhizom	Rhizom- spitzen	Knöllchen	Rhizom	Rhizom- spitzen
Komponente / Stoffgruppe						
	absolute Gehalte [%]					
Equisetumpyron	0,16	0,71	2,14	0,14	0,23	0,48
Gesamtgehalte Pyrone	0,26	1,20	4,71	0,21	0,46	1,76
MKWS	0,003	0,023	0,085	0,005	0,009	0,32
DKMWS	0,001	0,049	0,41	0,001	0,004	0,36
Gesamtgehalt HZS	0,045	0,14	0,56	0,038	0,056	1,05
Gesamtgehalt Phenole	0,30	1,34	5,27	0,25	0,52	2,82
	relative Gehalte [%]					
Quotienten						
EP / Ges. Pyrone	63	59	45	65	49	27
DKMWS / Ges. HZS	2	36	72	3	7	35
HZS / Ges. Phenole	14	10	11	15	11	37

Zusammenfassende Betrachtung der untersuchten Rhizome verschiedener Arten im Subgenus *Equisetum*

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen bestätigen mit einigen Ausnahmen das Vorkommen der in *E. arvense* gefundenen Styrylpyrone im gesamten übrigen Subgenus. Equisetumpyron (**25**) konnte in sämtlichen untersuchten Rhizomen gefunden werden und war in allen Arten die Hauptkomponente der Styrylpyrone. Auch die bisher noch nicht identifizierte Komponente Pyron 5 (**41**) wurde in allen Proben detektiert. Die in *E. arvense* in höheren Gehalten akkumulierten Komponenten *p*-Methoxyequisetumpyron (**39**) und 3'-Dehydroxy-Equisetumpyron (**36**) wurden bei den übrigen untersuchten Arten in deutlich geringeren Konzentrationen detektiert. Bei *E. sylvaticum* konnten sie nicht nachgewiesen werden. Abweichungen ergaben sich auch für die in *E. arvense* nur in Spuren vorkommenden Komponenten Pyron 1 (**31**), Pyron 3 (**37**) und Pyron 12 (**11**) (vergleiche Tabelle 7.1-3 im Anhang). Weitere Pyrone konnten mit einer Ausnahme (siehe unten) in Rhizomen des Subgenus *Equisetum* nicht gefunden werden. Die relativen und absoluten Gehalte einzelner Styrylpyrone in Rhizomen verschiedener Arten sind in Abbildung 3.2-3 und Abbildung 3.2-4 dargestellt.

Ergebnisse

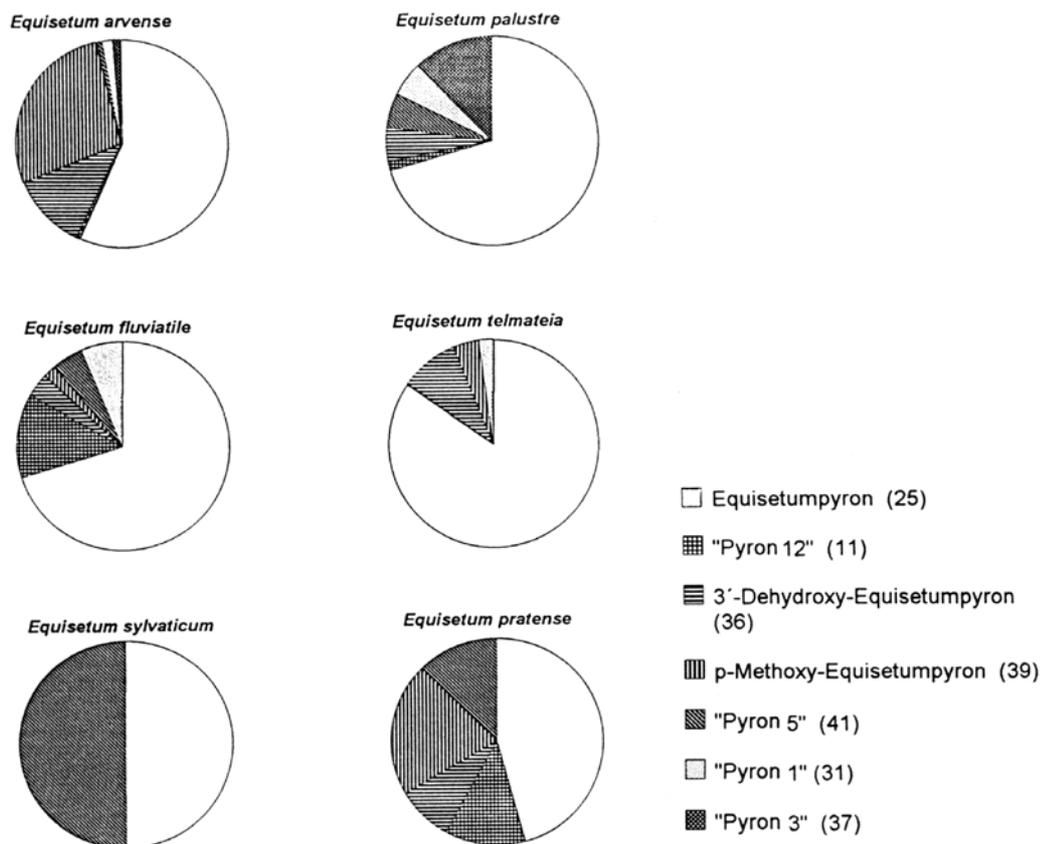


Abbildung 3.2-3: Relative Anteile [%] einzelner Styrylpyronderivate am Pyrongesamtgehalt in Rhizomen verschiedener Arten des Subgenus *Equisetum* (vgl. Tabelle 7.1-2 und 7.1-3 im Anhang).

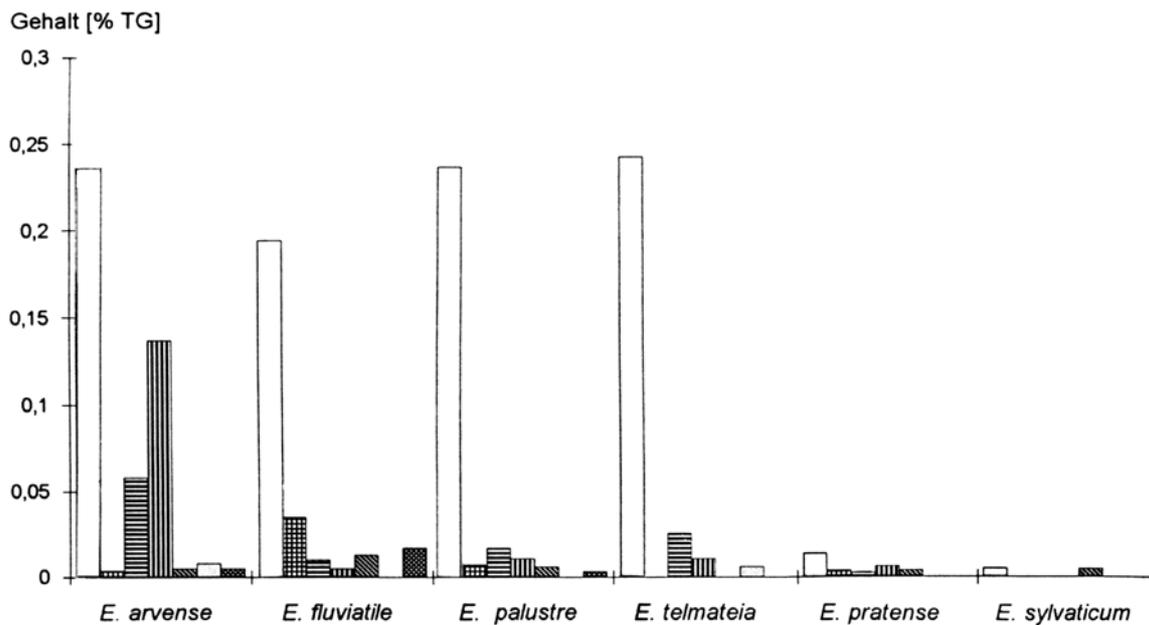


Abbildung 3.2-4: Absolute Gehalte [% TG] einzelner Styrylpyronderivate in Rhizomen verschiedener Arten des Subgenus (vgl. Tabelle 7.1-2 und 7.1-3 im Anhang); Legende siehe Abbildung 3.2-3.

In der Akkumulation von Hydroxyzimtsäurederivaten zeigten die Arten des Subgenus *Equisetum* eine deutliche Variabilität. In allen Arten konnte die Säure C2 (**24**) gefunden werden. Bei *E. sylvaticum*, *E. pratense*, *E. telmateia* und *E. palustre* trat sie als eine der Hauptkomponenten auf. Dikaffeoyl-meso-weinsäure (**50**) dagegen wurde außer in *E. arvense* nur in einzelnen Proben von *E. palustre* detektiert. Monokaffeoyl-meso-weinsäure (**10**) wurde neben *E. arvense* und *E. palustre* nur bei *E. telmateia* gefunden. Nur bei *E. sylvaticum*, *E. pratense* und *E. telmateia* hingegen wurden die Komponenten H1 (**1**) und H4 (**5**) gefunden. Teilweise wurden Hydroxyzimtsäurederivate nur als Spurenkomponenten detektiert und ließen sich deshalb nicht immer eindeutig in allen Analysen nachweisen bzw. zuordnen. Sämtliche detektierten Hydroxyzimtsäurederivate sind in Tabelle 3.2-3 aufgeführt (vgl. auch Tabelle 7.1-2 und 7.1-3 im Anhang).

In Abbildung 3.2-5 sind die relativen Gehalte beider phenolischer Stoffgruppen der Rhizome verschiedener Arten einander gegenübergestellt. Bei den Arten *E. fluviatile* und *E. arvense* überwiegen quantitativ deutlich die Styrylpyrone. Bei *E. sylvaticum* und *E. pratense* hingegen dominieren die Hydroxyzimtsäurederivate. *E. telmateia* und *E. palustre* nehmen bei dieser Betrachtungsweise eine Zwischenstellung ein. Das Verhältnis der Stoffgruppen ist ausgeglichener. Die Inhaltsstoffmuster der untersuchten Gewebe zeigten geringe arttypische Charakteristika. Die Muster der verschiedenen Vertreter unterschieden sich nicht so deutlich, dass die zugehörige Art identifiziert werden könnte. Die Muster der beiden Arten *E. sylvaticum* und *E. pratense* beispielsweise stimmten weitgehend überein, obwohl sich andererseits diese beiden Arten z. B. von *E. arvense* bei Betrachtung ihrer Chromatogramme deutlich unterschieden (siehe Abbildung 3.2-6, Abbildung 3.2-7 und Abbildung 3.2-8). Im Gegensatz zu den Inhaltsstoffmustern der oberirdischen Triebe konnte deshalb keine genaue Artzuweisung erfolgen. Signifikante Leitsubstanzen fehlten bzw. arttypische Verbindungen wie einzelne Hydroxyzimtsäurederivate konnten oft nur als Spurenkomponenten detektiert werden (vergleiche Tabellen 7.1-2 und 7.1-3 im Anhang). Eine Ausnahme bildete die Akkumulation von Protoflavonoiden bei *E. fluviatile*. Die strukturaufgeklärte Komponente war dabei Protoapigenin-4'-O-glucosid. Daneben traten drei weitere Protoflavonoide auf, die anhand charakteristischer *on-line*-UV-Spektren eindeutig dieser Substanzgruppe zugeordnet werden konnten. Das Flavonderivat Apigenin-4'-O-glucosid wurde ebenfalls in Spuren detektiert. Die Peakzuordnung erfolgte durch Coelution mit einem Gemisch der Substanzen Protoapigenin-4'-O-glucosid und Protogenkwain-4'-O-glucosid.

Ergebnisse

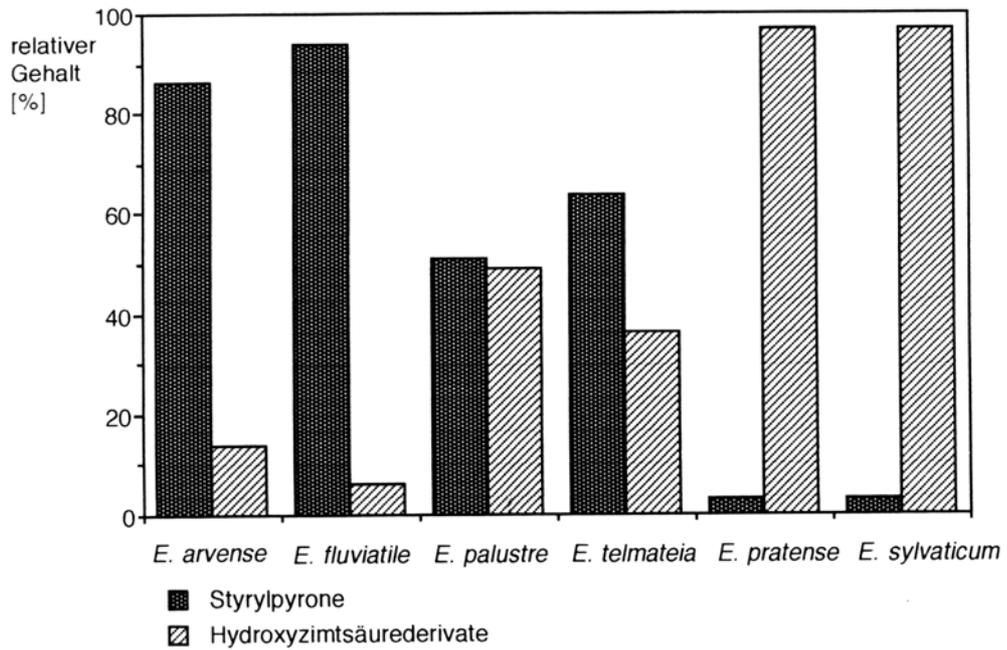


Abbildung 3.2-5: Relative Anteile [%] von Styrylpyronen und Hydroxyzimtsäurederivaten am Gesamtphenolgehalt verschiedener Arten des Subgenus Equisetum.

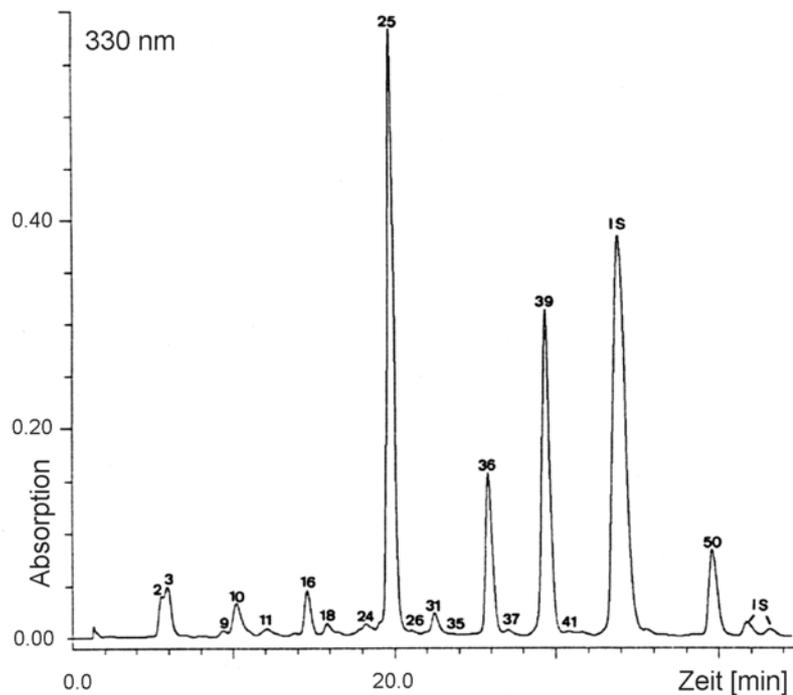


Abbildung 3.2-6: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus Rhizomen von *Equisetum arvense* L.. Die Peaknumerierung bezieht sich auf Tabelle 7.1-1 im Anhang. Detektion 330 nm; IS = Innerer Standard.

Ergebnisse

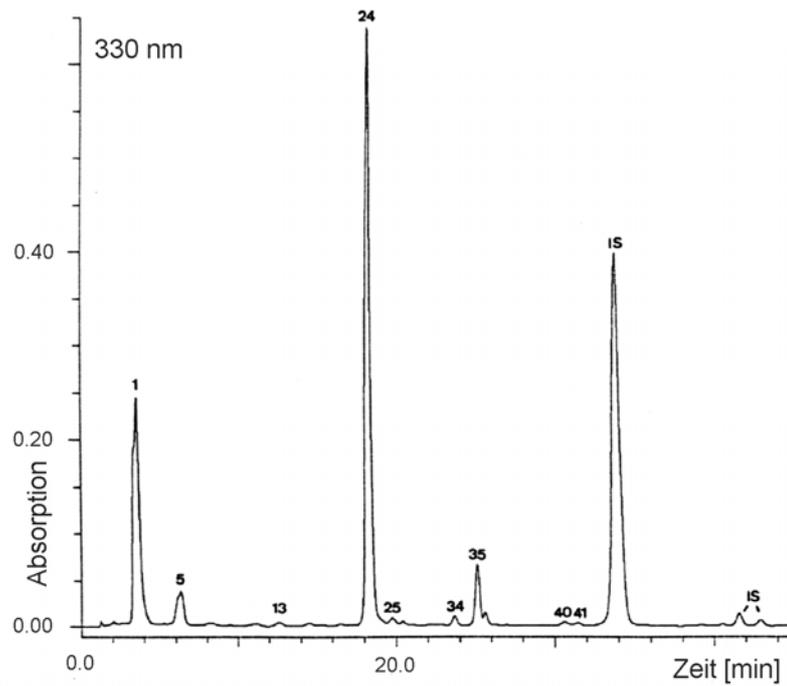


Abbildung 3.2-7: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus Rhizomen von *Equisetum sylvaticum* L.. Die Peaknumerierung bezieht sich auf Tabelle 7.1-1 im Anhang. Detektion 330 nm; IS = Innerer Standard.

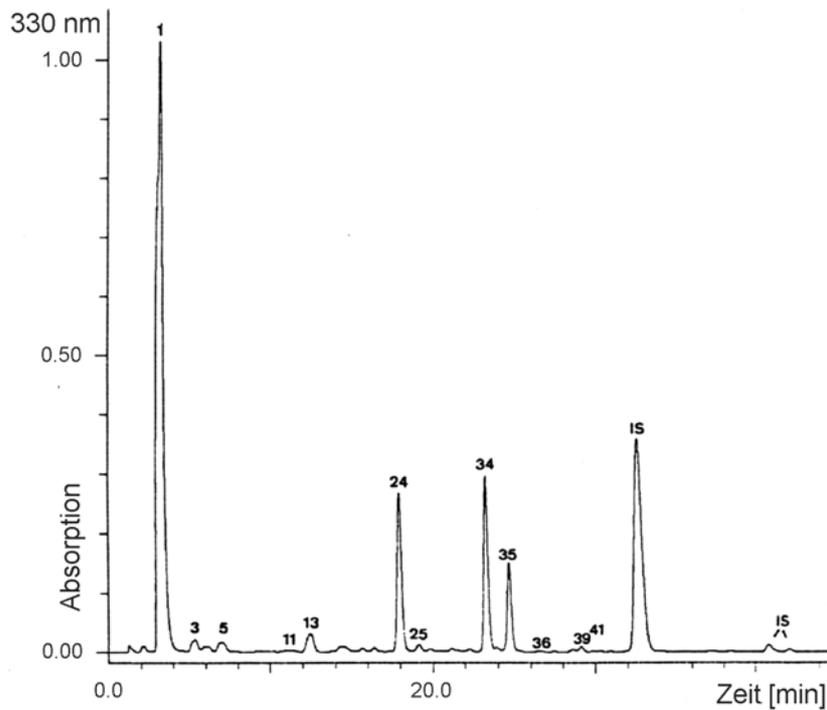


Abbildung 3.2-8: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus Rhizomen von *Equisetum pratense* EHRH.. Die Peaknumerierung bezieht sich auf Tabelle 7.1-1 im Anhang. Detektion 330 nm; IS = Innerer Standard.

Ergebnisse

Tabelle 3.2-3: Hydroxyzimtsäurederivate in Rhizomen verschiedener Arten des Subgenus Equisetum. ++ = Hauptkomponente; + = nachgewiesen; -= nicht nachgewiesen; (+) = wurde nicht in allen Proben dieser Art detektiert;; HZS = Hydroxyzimtsäurederivat; MKWS = Monokaffeoyl-*meso*-weinsäure; DKMWS = Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure.

Art		<i>E.</i> <i>arvense</i>	<i>E.</i> <i>fluviatile</i>	<i>E.</i> <i>pratense</i>	<i>E.</i> <i>sylvaticum</i>	<i>E.</i> <i>palustre</i>	<i>E.</i> <i>telmateia</i>
Nr.	Komponente						
1	HZS H1	-	-	++	+	-	++
2	HZS H2	+	+	-	-	(+)	-
3	HZS H3	+	+	+	-	+	-
5	HZS H4	-	-	+	+	-	+
7	HZS H5	-	-	-	-	(+)	(+)
8	Chlorogensäure	-	+	-	-	-	-
9	HZS H6	+	-	-	-	(+)	-
10	MKMWS	+	-	-	-	+	(+)
13	HZS H7	-	-	+	+	-	(+)
16	HZS H8	+	-	-	-	+	-
18	HZS H9	(+)	-	-	-	+	-
23	HZS H12	(+)	-	-	-	-+	-
24	HZS C2	+	+	++	++	+	++
34	HZS H15	-	-	+	+	+	+
35	HZS H16	+	-	-	+	+	+
40	HZS H17	-	-	-	(+)	(+)	-
50	DKMWS	+	-	-	-	(+)	-

Phenolische Komponenten der Rhizome von Hybriden

Ergänzend zu den Analysen der Rhizome verschiedener Arten des Subgenus Equisetum wurde untersucht, inwieweit Rhizome von Hybriden intermediäre bzw. additive Inhaltstoffmuster aufweisen wie sie für einige Hybriden des Subgenus nachgewiesen wurden (VEIT *et al.* 1995A). Anhand der Muster der Styrylpyrone konnten lediglich durch Vergleich der relativen Gehalte einzelner Pyrone die Beziehung zu den jeweiligen Elternarten hergestellt werden. Deutlichere Unterschiede ließen sich durch den Vergleich einzelner Hydroxyzimtsäurederivate sowie der Akkumulation von Protoflavonoiden feststellen. Die Muster der Hydroxyzimtsäurederivate der untersuchten Taxa waren weitgehend intermediär. Die Ergebnisse der Untersuchungen steriler oberirdischer Sporophyten konnten dadurch bestätigt werden. In Rhizomen fehlen jedoch signifikante Leitsubstanzen die genaue chemotaxonomische Fragestellungen beantworten lassen. Eine systematische Klassifizierung von Hybriden anhand kryptischer Merkmale von Rhizomen muss sich darauf beschränken, dass einzelne Arten als Eltern ausgeschlossen werden können. Detektierte Komponenten der Rhizome von Hybriden im Vergleich zu denen ihrer Elternarten sind in Tabelle 3.2-4 zusammengestellt.

Ergebnisse

Tabelle 3.2-4: Phenolische Komponenten in Rhizomen verschiedener Hybriden des Subgenus Equisetum. Die kleinen Buchstaben geben an, bei welcher Elternart die jeweilige Komponente vorkommt; t = *E. telmateia*, p = *E. palustre*, a = *E. arvense*, f = *E. fluviatile*; ++ = Hauptkomponente, + = nachgewiesen, (-) = Akkumulation konnte wegen möglicher Coelution nicht ausgeschlossen werden, *) = nicht alle Komponenten dieser Stoffgruppe, die bei der Hybride detektiert wurden, treten bei der Elternart auf; EP = Equisetumpyron, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat; MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure; DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure; Ges. = Gesamtgehalt.

Nr.	Hybride Komponente	<i>E. x font-queri</i>			<i>E. litorale</i>			<i>E. x rothmaleri</i>			<i>E. x dycei</i>		
11	Pyron12	-	p		a	+	f	a	+	p	f	+	p
25	Equisetumpyron	t	++	p	a	++	f	a	++	p	f	++	p
31	Pyron1	t	+	p	a	(-)		a	(-)	p		(-)	p
36	3'-Dehydroxy-EP	t	+	p	a	+	f	a	+	p	f	+	p
37	Pyron3	t	+	p	a	+	f	a	+	p	f	+	p
39	p-Methoxy-EP		+	p	a	+	f	a	+	p	f	+	p
41	Pyron5	t	+	p	a	+	f	a	+	p	f	+	p
1	HZS H1	t	9			-			-			-	
2	HZS H2		+	p	a	+	f	a	+	p		+	p
3	HZS H3		+	p	a	+	f	a	+	p	f	+	p
7	HZS H5	t	+	p		-			-			-	
8	Chlorogensäure		-			+	f		-		f	-	
10	MKMWS	t	+	p	a	+	f	a	+	p	f	+	p
16	HZS H8		+	p		-			-	p		-	p
18	HZS H10		+	p		-			-	p		-	p
24	HZS C2	t	+	p	a	+	f	a	+	p	f	+	p
35	HZS H16	t	+	p	a	+		a	+	p		+	p
45	HZS H20		-			-	f		+		f	+	
50	DKMWS		-		a	+		a	+			+	p
	Protoflavonoide		-		a*)	+	f	a*)	+		f	+	

absolute Gehalte [%TG]

Gesamtgehalt Pyrone	0,35	0,57	1,20	0,89
Gesamtgehalt HZS	0,038	0,063	0,143	0,084

Quotienten relative Gehalte [%]

EP / Ges. Pyrone	95	64	77	79
HZS / Ges. Phenole	10	9	11	7

Internodien im Übergangsbereich zwischen Rhizom und „photosynthetisch aktivem Spross“

Die Akkumulationsmuster von Sprossabschnitten im Übergang der unterirdisch wachsenden Rhizome zu oberirdischen Sprossen wurden an einer Pflanze von *Equisetum arvense* untersucht (Topfkultur, Herkunft Korsika). Dazu wurden Sprossabschnitte des Übergangsbereiches in einzelne Internodien getrennt und separat aufgearbeitet. Gleichzeitig wurden zum Vergleich Proben vom Gesamtspross (G) und vom Gesamtrhizom (R) analysiert. Die Lage sowie die typische Länge der einzelnen Internodien in dem untersuchten Sprossabschnitt zeigt Abbildung 3.2-9. Das Segment 1 zeigt eine Rhizomverzweigung und Adventivwurzeln; dieser Bereich lag im Boden. Optisch unterschieden sich die Sprossbereiche an ihrer Farbe bzw. an der Pigmentierung ihrer Rinde. Der Farbwechsel von braun zu grün war nicht abrupt. Die Segmente wiesen eher fließende, teilweise fleckige Übergangszonen auf. Internodien von bodennahen Bereichen waren blassgelb, somit chlorophyllarm. Die Seitensprossverzweigung und eine deutliche Grünfärbung begann bei den untersuchten Sprossen am Internodium 6.

In Abbildung 3.2-10 sind die relativen Anteile der drei phenolischen Stoffgruppen Styrylpyrone, Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide der untersuchten Abschnitte dargestellt (siehe auch Tabelle 7.1-3 im Anhang). Der Pyrongesamtgehalt nahm in den oberirdischen Internodien auf einen Wert unter 1 % des Gehaltes der Rhizome ab. Parallel wurden steigende Werte im Flavonoidgehalt gefunden. Bemerkenswert an diesem Ergebnis ist, dass in den mittleren Internodien größere Mengen von Flavonoid- und Pyronglycosiden nebeneinander akkumulierten. In allen untersuchten Internodien wurden Pyrone gefunden. Das für Rhizome typische Pyronmuster wurde auch in oberirdischen Internodien detektiert. Abweichend zeigte nur Pyron 5 (**41**) einen höheren Anteil in den Segmenten 1-3 des Übergangsbereiches. In Internodium 4-6 wurde lediglich Equisetumpyron (**25**) in Spuren gefunden. In der Probe des Gesamtsprosse G, die keine „bodennahen“ Pflanzenteile enthielt, wurden keine Pyrone detektiert. Hier sollte angefügt werden, dass in anderen Untersuchungen (VEIT 1990), vor allem in der zweiten Hälfte der Vegetationsperiode in sterilen oberirdischen Sprossen von *E. arvense* ebenfalls geringe Mengen an Equisetumpyron (**25**) gefunden wurden. Bei Untersuchungen steriler Sprosse von Pflanzen, die im Frühjahr geerntet wurden, akkumulierten übereinstimmend mit früheren Arbeiten keine Pyrone (siehe Tabelle 7.1-4 im Anhang). Oberirdisches Sprossgewebe von „Sommertrieben“, an denen charakteristische Verbräunungen auftraten, wurden genauer untersucht; die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Hydroxyzimtsäurederivate waren in allen untersuchten Abschnitten deutlich detektierbar. Im Internodiumabschnitt 5 wurde gegenüber dem Wert in Rhizomen ein doppelter Gehalt ermittelt. In den Internodien 2-6 bildeten sie die dominierende Gruppe löslicher phenolischer Inhaltsstoffe. Die Hauptkomponente der Hydroxyzimtsäurederivate war in allen Abschnitten Dikaffeoyl-meso-weinsäure mit durchschnittlich 40 % relativem Anteil (siehe Tabelle 7.1-4 im Anhang). Auch die Säuren Monokaffeoyl-meso-weinsäure (**10**), C2 (**24**) und H3 (**3**) wurden in allen Proben in größeren Mengen gefunden. Für einzelne Hydroxyzimtsäurederivate konnte eine

organspezifische Akkumulation festgestellt werden. Die Gehalte dieser Komponenten änderten sich in den untersuchten Internodien schrittweise. So wurde Komponente H8 (**16**) nur in Rhizomen und in den beiden unteren Internodien 1 und 2 detektiert. Die Säuren H12 (**23**) und H16 (**35**) wurden im Rhizom (R) und in den unteren Internodien in Spuren detektiert, und konnten mit steigenden Werten in weiter oben gelegenen Abschnitten gefunden werden (siehe Tabelle 7.1-4 im Anhang). Ebenso stieg der Gehalt an Säure C2 in Richtung grüner Spross an. In den untersuchten Internodien wurden die Protoflavonoide, Protoapigenin-4'-O-glucosid (**20**) und Protogenkwain-4'-O-glucosid (**38**) detektiert. Während im Rhizom (R) nur Protoapigenin-4'-O-glucosid nachweisbar war, wurden beide Protoflavonoide mit steigenden Werten in Internodien des Übergangsbereiches (ab Internodium 2) und im Gesamtspross (G) detektiert.

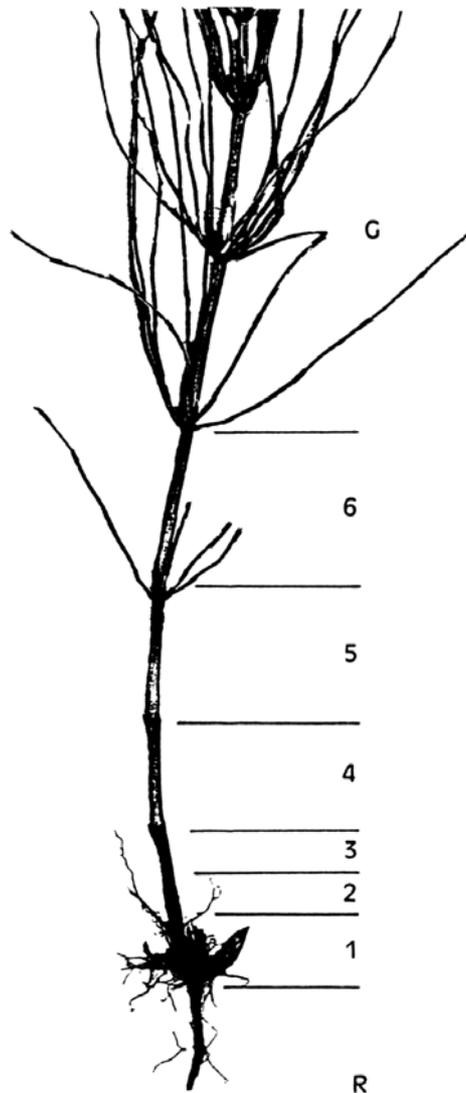


Abbildung 3.2-9: Untersuchung einzelner Internodien des Sprossabschnittes im Übergangsbereich zwischen Rhizom und oberirdischem Spross. Darstellung (Fotokopie) eines Sprosses von *Equisetum arvense* L. mit Angabe der untersuchten Internodien und Organe; G = Gesamtspross; R = Gesamtrhizom.

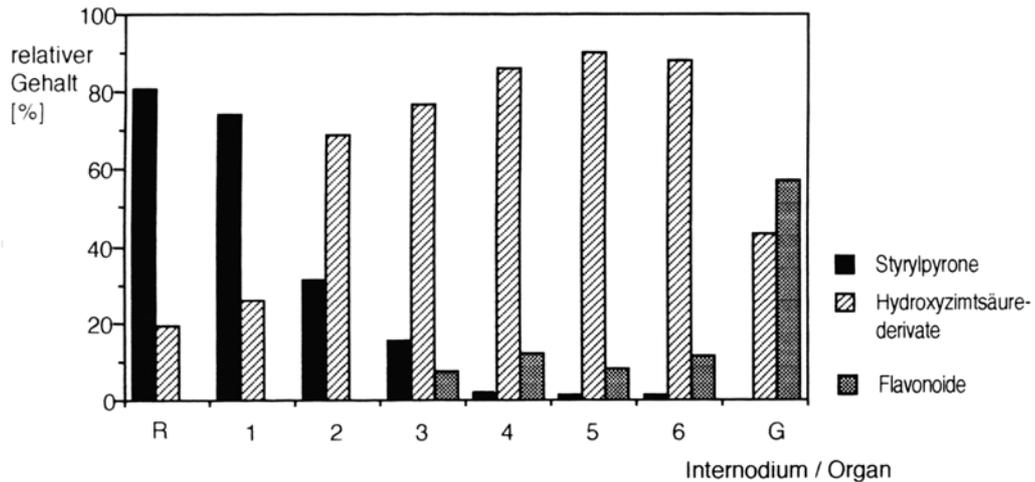


Abbildung 3.2-10: Relative Gehalte [%] der phenolischen Stoffgruppen einzelner Internodien bezogen auf den Gesamtphenolgehalt.

3.2.2 Untersuchungen steriler oberirdischer Sprossabschnitte von *Equisetum arvense* L. mit charakteristischen Gewebeverbräunungen

Im Verlauf der Vegetationsperiode bildeten sich an einzelnen oberirdischen Trieben von *E. arvense* L. oberflächlich sichtbare braun-schwarze Verfärbungen. Diese Verbräunungen tauchten meist am Hauptspross auf, konnten aber auch an Seitensprossen festgestellt werden.



Abbildung 3.2-11: Sterile Sprosse von *Equisetum arvense* L. mit charakteristischen Gewebeverbräunungen.

Das Ausmaß der Pigmentierung reichte von punktförmigen kleinen Flecken bis hin zu stängelumfassenden, sich über mehrere Internodien erstreckende Verfärbungen. Meist traten die Verbräunungen als dunkle Längsstreifen entlang eines Internodiums auf (siehe Abbildung 3.2-11). Die Erscheinung war nicht auf *E. arvense* beschränkt, und konnte auch an Sprossen anderer Arten, beispielsweise *E. palustre* L. und *E. litorale* KÜHL EX RAPP beobachtet werden.

Mikroskopische Untersuchung

Querschnitte dieser Sprossbereiche wurden als Frischpräparate im Durchlicht und nach konventioneller Fluoreszenzanregung mikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 3.2-12 bis Abbildung 3.2-15). Bei Betrachtung des ganzen Querschnittes im Hellfeld wird zunächst das Ausmaß der Verbräunung im Gewebe sichtbar (Abbildung 3.2-12). Dunkel pigmentiert sind die Zellwände der unmittelbar unter der Epidermis liegenden Schichten des Festigungsgewebes (Rippenbast) und des Rindenparenchyms. Tiefere Zellschichten der Rinde sind teilweise betroffen.

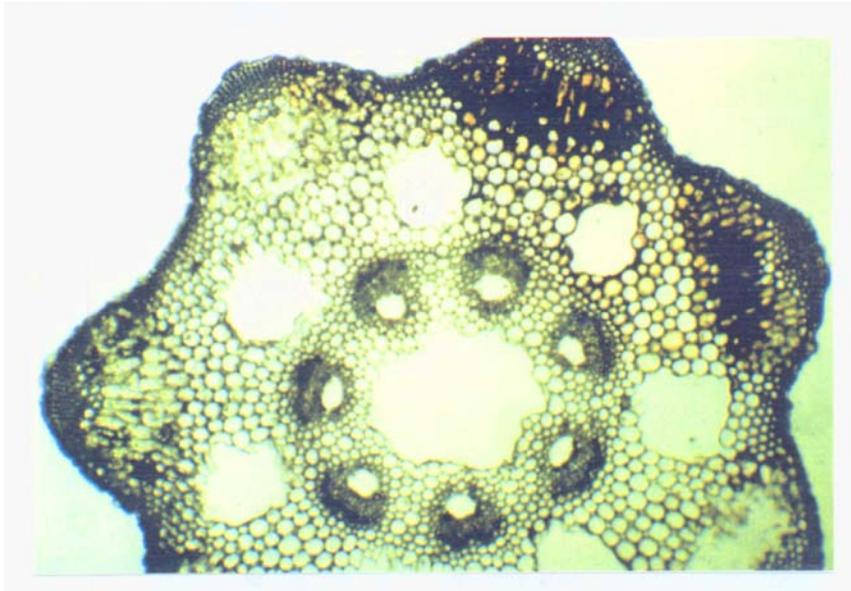


Abbildung 3.2-12: Querschnitt durch einen Spross von *Equisetum arvense* L. im Bereich einer Verbräunung bei Durchlichtbetrachtung im Hellfeld (Ortholux II).

Eine ungleichmäßig auftretende Pigmentierung der Zellwand einzelner Zellen des Rindenparenchyms ist bei starker Vergrößerung an dem Schnitt von Abbildung 3.2-13 gut zu erkennen. Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung desselben Querschnittes (Abbildung 3.2-14) nach Anregung mit 400-450 nm (Emission > 515 nm) wird eine gelbe Fluoreszenz in Zellwänden dieser Bereiche sichtbar. In der Umgebung der verbräunten Bereiche fluoreszieren die Epidermis und die Zellen des Zentralzylinders insbesondere im Bereich der Endodermis stark. An Stellen die deutlich pigmentiert sind, fehlt eine Fluoreszenz. Auch Zellen im Rindenparenchym, die von der Verbräunung nicht betroffen sind, zeigen in Zellwänden keine Fluoreszenz. Dort fluoreszieren lediglich Chloroplasten im Rotbereich (Chlorophyllfluoreszenz 685/695 nm). Weiter fällt auf, dass einzelne Zellen im Rindenparenchym bei gleicher Anregung eine blaue Fluoreszenz im Zellumen aufweisen.

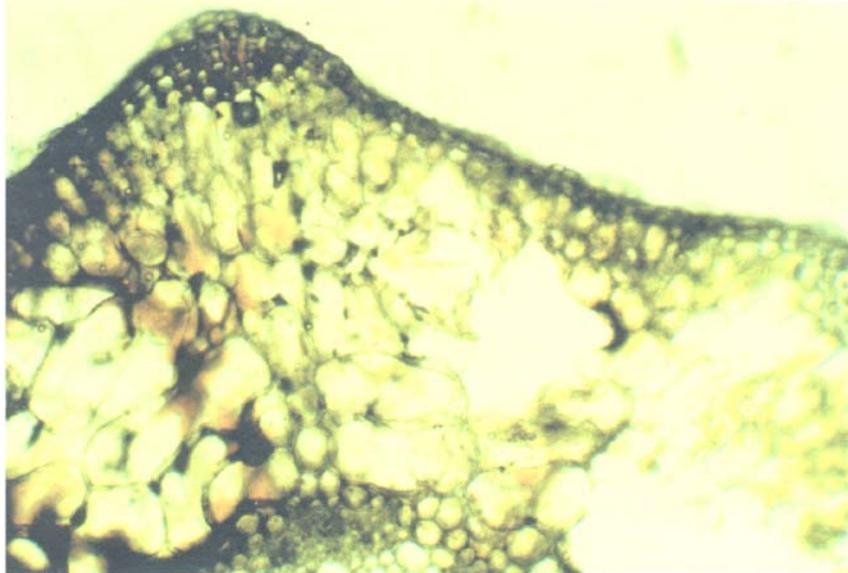


Abbildung 3.2-13: Querschnitt durch einen Spross von *Equisetum arvense* L. im Bereich einer Verbräunung bei Durchlichtbetrachtung im Hellfeld (OrtholuxII).

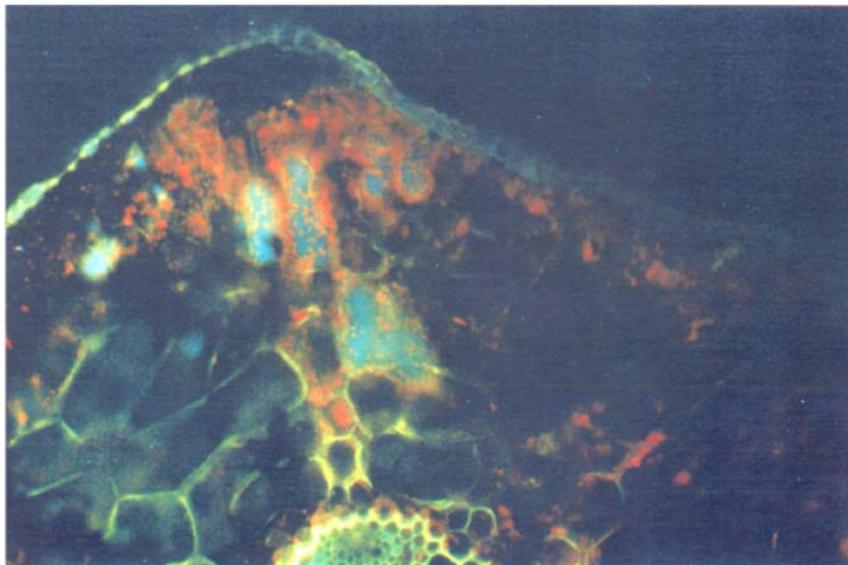


Abbildung 3.2-14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Schnittes von Abbildung 3.2-13 nach Anregung mit 450-490 nm; Emission > 515 nm (konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, Ortholux II).

Abbildung 3.2-15 zeigt die Aufnahme eines anderen Sprossquerschnittes mit dunkel pigmentiertem Gewebe nach Fluoreszenzanregung mit 340-380 nm (Emission > 440 nm). Das Fluoreszenzmuster ist vergleichbar mit dem von Abbildung 3.2-14 (Emission > 515 nm). In dieser Aufnahme fallen „gelb fluoreszierende Ringe“ an der Innenseite von Zellen auf, deren Zellwände dunkel pigmentiert sind; offenbar Reste kollabierter Protoplasten. Die meisten Zellen der verbräunten Bereiche sind demnach abgestorben. Die fluoreszenzmikroskopischen Besonderheiten insbesondere die scheinbare Löschung der Fluoreszenz in dunkel pigmentierten Bereichen stimmt mit Beobachtungen an Querschnitten

von Rhizomen überein. Dort sind die Epidermis und die darunterliegenden Schichten braun gefärbt und zeigen bei gleicher Fluoreszenzanregung ebenfalls keine Emission.

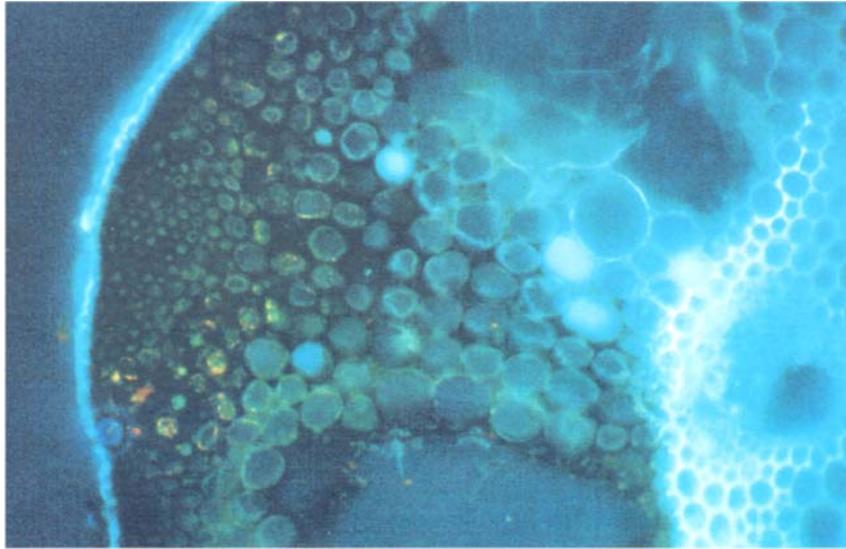


Abbildung 3.2-15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Querschnittes durch einen Spross von *Equisetum arvense* L. im Bereich einer Verbräunung nach Anregung mit 340-380 nm; Emission 430 nm (konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, Ortholux II).

Analyse der Inhaltsstoffe

In Verbindung mit der Verbräunung der Sprosse konnte eine Akkumulation von Styrylpyronen in diesen nekrotisierten Gewebeabschnitten der oberirdischen Sporophyten festgestellt werden.

Mehrere gleich gestaltete Sprossabschnitte wurden ausgewählt, wie in Abbildung 3.2-16 schematisch dargestellt, getrennt, separat aufgearbeitet und mit HPLC analysiert. In allen drei Abschnitten konnten Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate mit dem für *E. arvense* typischen Inhaltsstoffmuster nachgewiesen werden. Zusätzlich traten in den von der Verbräunung betroffenen Geweben Styrylpyrone als phenolische Komponenten auf. Die Akkumulation der Pyrone ist auf diese Bereiche beschränkt. In den der Verfärbung gegenüberliegenden Gewebebereichen des Sprosses und an anderen „grünen“ Sprossabschnitten konnten keine Styrylpyrone detektiert werden. In Abschnitt 2, der Bereich der nicht vollständig pigmentiert war, wurde ein höherer Gehalt an Pyronen als im vollständig pigmentierten Abschnitt 3 ermittelt (Abbildung 3.2-16). Das Mengenverhältnis einzelner detektierbarer Styrylpyrone entsprach etwa dem in Rhizomen. Detektiert wurden Equisetumpyron (**25**) als Hauptkomponente der Pyrone, daneben *p*-Methoxyequisetumpyron (**39**), Pyron 1 (**30**) und Pyron 5 (**41**). Die in Rhizomen von *E. arvense* akkumulierten Komponenten 3'-Dehydroxy-Equisetumpyron, Pyron 12 (**11**) und Pyron 3 (**37**) konnten nicht nachgewiesen werden. Auch heller bräunlich verfärbte Abschnitte von vertrockneten Seitensprossen wurden untersucht, wiesen aber keinerlei Styrylpyrone auf (siehe Abbildung 3.2-11).

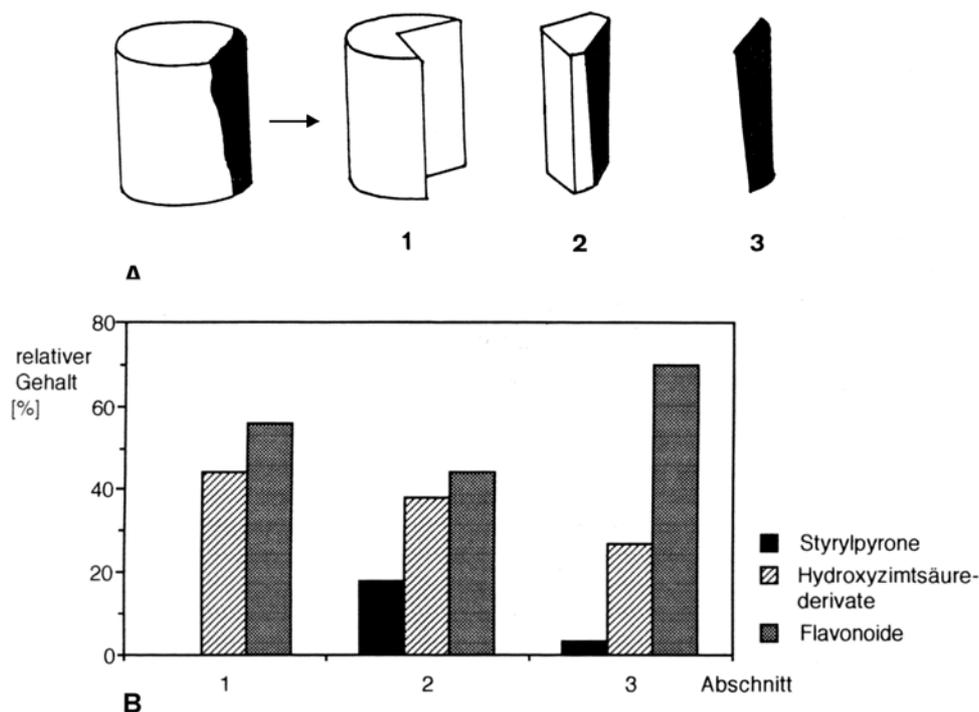


Abbildung 3.2-16: Inhaltsstoffanalyse dunkelpigmentierter Gewebeabschnitte steriler oberirdischer Triebe von *Equisetum arvense* L.. A: Schematische Darstellung der Trennung von Sprosssegmenten mit verbräunten Gewebebereichen in einzelne Abschnitte; B: Relative Anteile phenolischer Stoffgruppen am Gesamtphenolgehalt in den einzelnen Abschnitten.

3.2.3 Zellwandgebundene Phenole

HPLC-MS Untersuchungen des Zellwandhydrolysates (siehe Abschnitt 2.4.2) sollten weitere Informationen über die Identität des als Hauptkomponente im sauren Hydrolysat erscheinenden Pyrons (**55**) ergeben. Die Komponente zeigte ein $[M+H]^+$ von $m/z = 523$ (siehe Abbildung 3.2-17), was mit dem Vorliegen eines über die C-C Brücke verknüpften Hydroxyhispidin-Dimers in Einklang gebracht werden konnte. Das Ion zeigte im MS-MS-Spektrum nur ein deutliches Fragment mit $m/z = 273$, dessen Identität noch unklar ist. Spekulativ könnte man eine Fragmentierung wie in Abbildung 3.2-18 gezeigt ist annehmen, die jedoch nicht bewiesen ist. Die dargestellte Verknüpfung beider Monomere entspricht der von 3,14-Bishispidinyl (KLAAR und STEGLICH 1977A), siehe auch Einleitung Abschnitt 1.3.

Ergebnisse

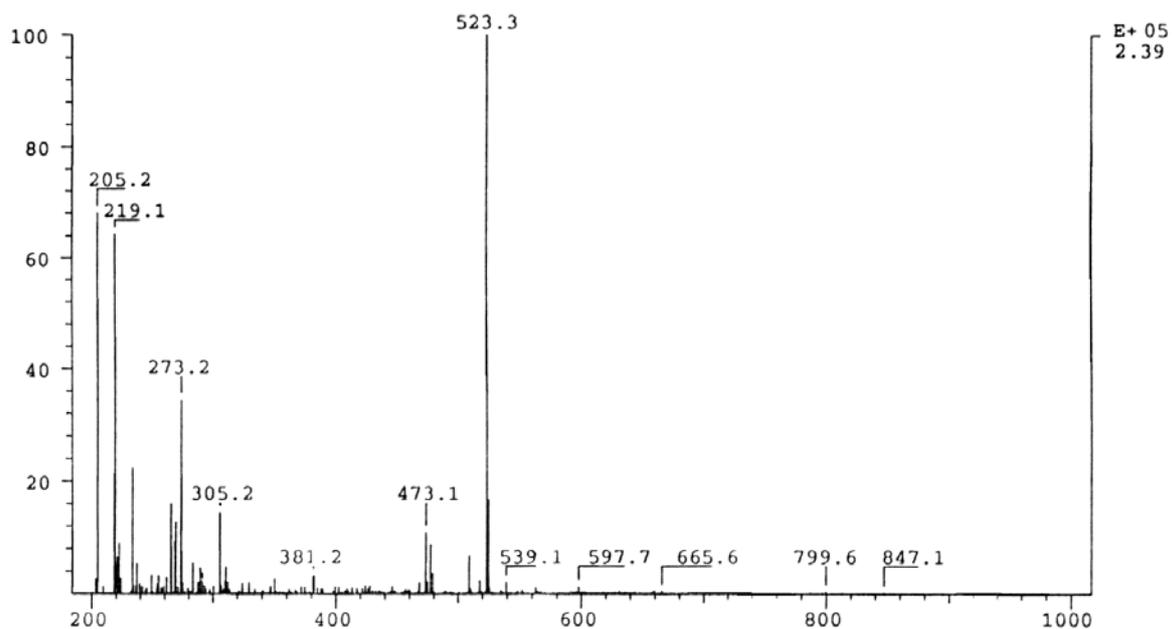


Abbildung 3.2-17: MS-Spektrum des Styrylpyronderivates aus dem sauren Hydrolysat der Extraktion zellwandgebundener Phenole.

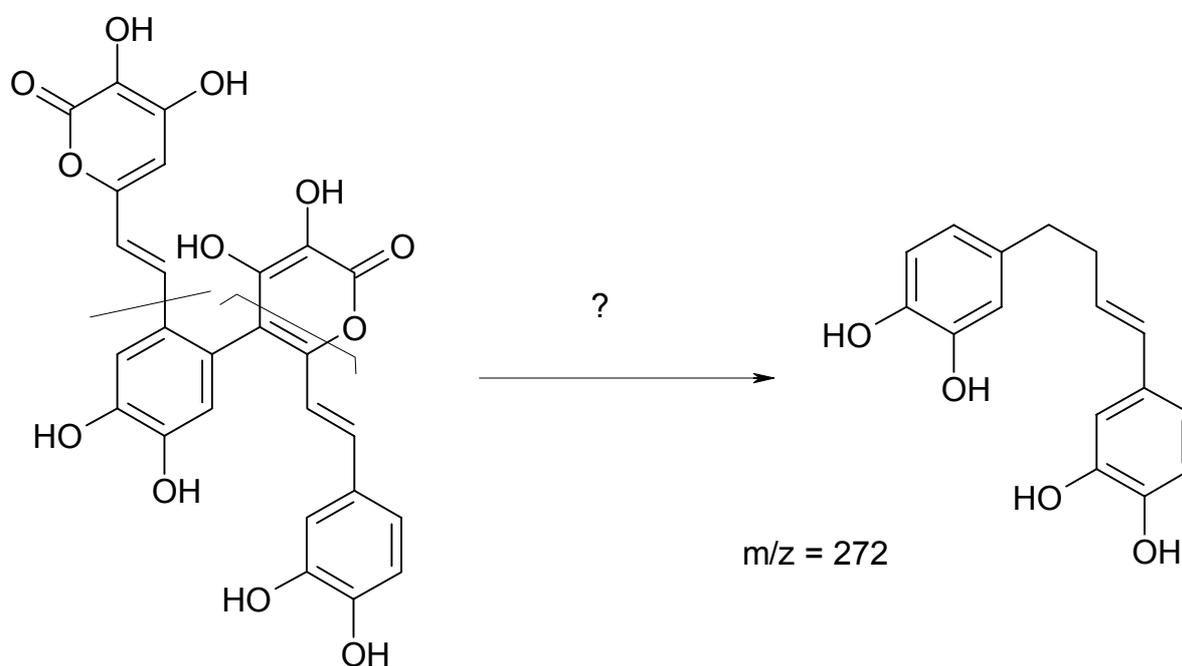


Abbildung 3.2-18: Mögliche Fragmentierung des vermuteten Hispidin-Dimers bei HPLC-MS-MS Analyse.

3.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Rhizomen und Prothallien der Gattung *Equisetum*

Fluoreszenzspektren

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden von den beiden Hauptinhaltsstoffgruppen der Rhizome und Prothallien von *Equisetum* die Reinsubstanzen Equisetumpyron, als Vertreter der Styrylpyrone und Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure, stellvertretend für die Hydroxyzimtsäurederivate ausgewählt. Ziel der Untersuchung war es, anhand der Daten von Fluoreszenzspektren die Substanzgruppen durch ihre Autofluoreszenz in mikroskopischen Präparaten nachzuweisen und zu differenzieren.

Vermessen wurden Lösungen von Equisetumpyron und Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure in Methanol, 50 % *aq.* Methanol, 10 % *aq.* Methanol. Daneben wurden Fluoreszenzspektren der Reinsubstanzen in den Lösungsmitteln Wasser, 50 % *aq.* PEG 400 und 50 % *aq.* Glycerin aufgenommen, die auch als Einbettungsmedien für Frischpräparate Verwendung finden sollten. Die Konzentrationen wurden so eingestellt, dass die Absorption der Lösungen im Bereich 0,5-0,6 lag. Das Fluoreszenzverhalten beider Stoffe wurde bei zwei Anregungswellenlängen, 365 nm und 488 nm untersucht. Die Messdaten sind in Tabelle 3.3-1 aufgeführt.

Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure lies sich mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm zur Fluoreszenz anregen, während bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm keine Autofluoreszenz auftrat. Das Maximum des Fluoreszenzspektrums der Verbindung in Methanol lag bei 450 nm. Verglichen mit einer methanolischen Lösung zeigte die Säure in Methanol-Wasser Gemischen mit zunehmenden Wasseranteil eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität. In Wasser wurde 7 % der Fluoreszenzintensität gemessen, verglichen mit einer äquimolaren Lösung von Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure in Methanol. Daneben wurde in der wässrigen Lösung bei 419 nm ein zweites Emissionsmaximum beobachtet. Die Fluoreszenzspektren der Säure in 50 % *aq.* PEG 400 und 50 % *aq.* Glycerin entsprachen hinsichtlich der Lage und Intensität denen der Substanz in 50 % *aq.* Methanol (vgl. Abbildung 3.3-1 **A**).

Equisetumpyron zeigte eine Eigenfluoreszenz bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 365 nm und 488 nm. Das Maximum des Spektrums der Substanz in Methanol nach Anregung mit 365 nm lag bei 500 nm. Wie bei Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure war die Fluoreszenzintensität einer methanolischen Lösung höher als in einer gleich konzentrierten wässrigen Lösung. Die Fluoreszenzminderung war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei dem Kaffeesäureester (siehe Abbildung 3.3-1 **B**). Nach Anregung mit 488 nm zeigte Equisetumpyron in Methanol ein Fluoreszenzspektrum mit Maximum bei 560 nm, verbunden mit einer deutlich verminderten Fluoreszenzintensität gegenüber der kurzwelligen Anregung (siehe Abbildung 3.3-2). Das Fluoreszenzspektrum von Equisetumpyron in 50 % PEG 400 wies bei Anregung mit 365 nm gegenüber der wässrigen und methanolischen Lösung eine geringfügige bathochrome Verschiebung auf. Dieser Effekt war bei Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure nicht zu beobachten (siehe Abbildung 3.3-1 **A** und Abbildung 3.3-1 **B**). Nach Anregung mit 488 nm zeigte das Spektrum von Equisetumpyron in 50 % PEG 400 das

Ergebnisse

gleiche Maximum wie in Methanol, die Intensität war, verglichen mit der in Wasser und Methanol im Maximum (560 nm) etwas höher (siehe Abbildung 3.3-2). In 50 % *aq.* Glycerin ergaben sich keine Unterschiede zum Fluoreszenzverhalten, verglichen mit 50 % *aq.* Methanol.

Die methanolischen Lösungen beider Substanzen zeigten nach Zusatz von 0,3 % (w/V) Naturstoffreagenz A eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität. Der Effekt wurde bei beiden Anregungswellenlängen beobachtet. Durch Reaktion mit Naturstoffreagenz A war auch bei Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure in Methanol nach Anregung mit 488 nm eine Fluoreszenz zu verzeichnen. Gleichzeitig trat bei allen Spektren eine bathochrome Verschiebung der Emissionsmaxima auf (siehe Tabelle 3.3-1). Ein methanolischer Extrakt aus Rhizomen von *E. arvense* hatte bei beiden Anregungswellenlängen ein ähnliches Fluoreszenzspektrum wie Equisetumpyron in Methanol. Das Emissionsmaximum lag nach Anregung mit 365 nm bei 490 nm, nach Anregung mit 488 nm bei 560 nm (Tabelle 3.3-1).

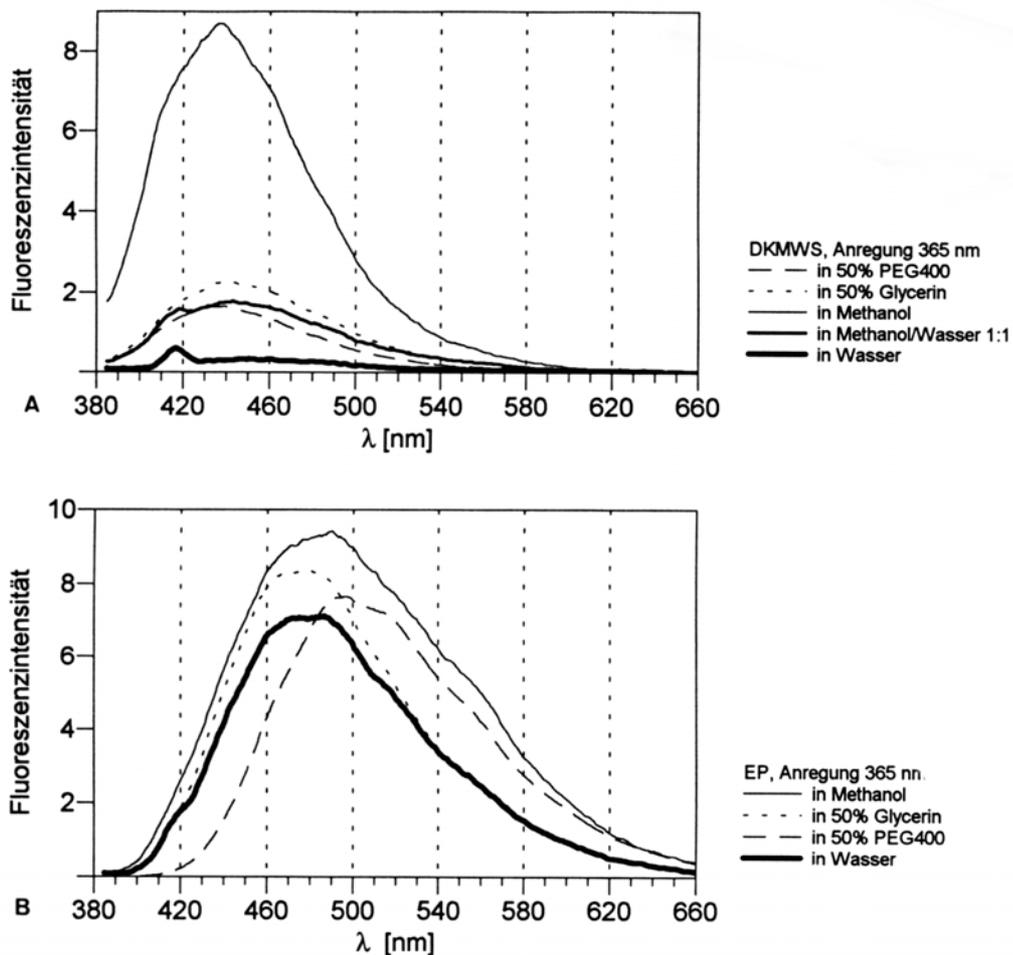


Abbildung 3.3-1: Fluoreszenzspektren von **A** Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure (DKMWS) und **B** Equisetumpyron (EP) in verschiedenen Lösungsmitteln nach Anregung mit 365 nm (siehe auch Tabelle 3.3-1). Für die graphische Darstellung der Spektren wurde die Fluoreszenzintensität proportional zur eingestellten Konzentration umgerechnet.

Ergebnisse

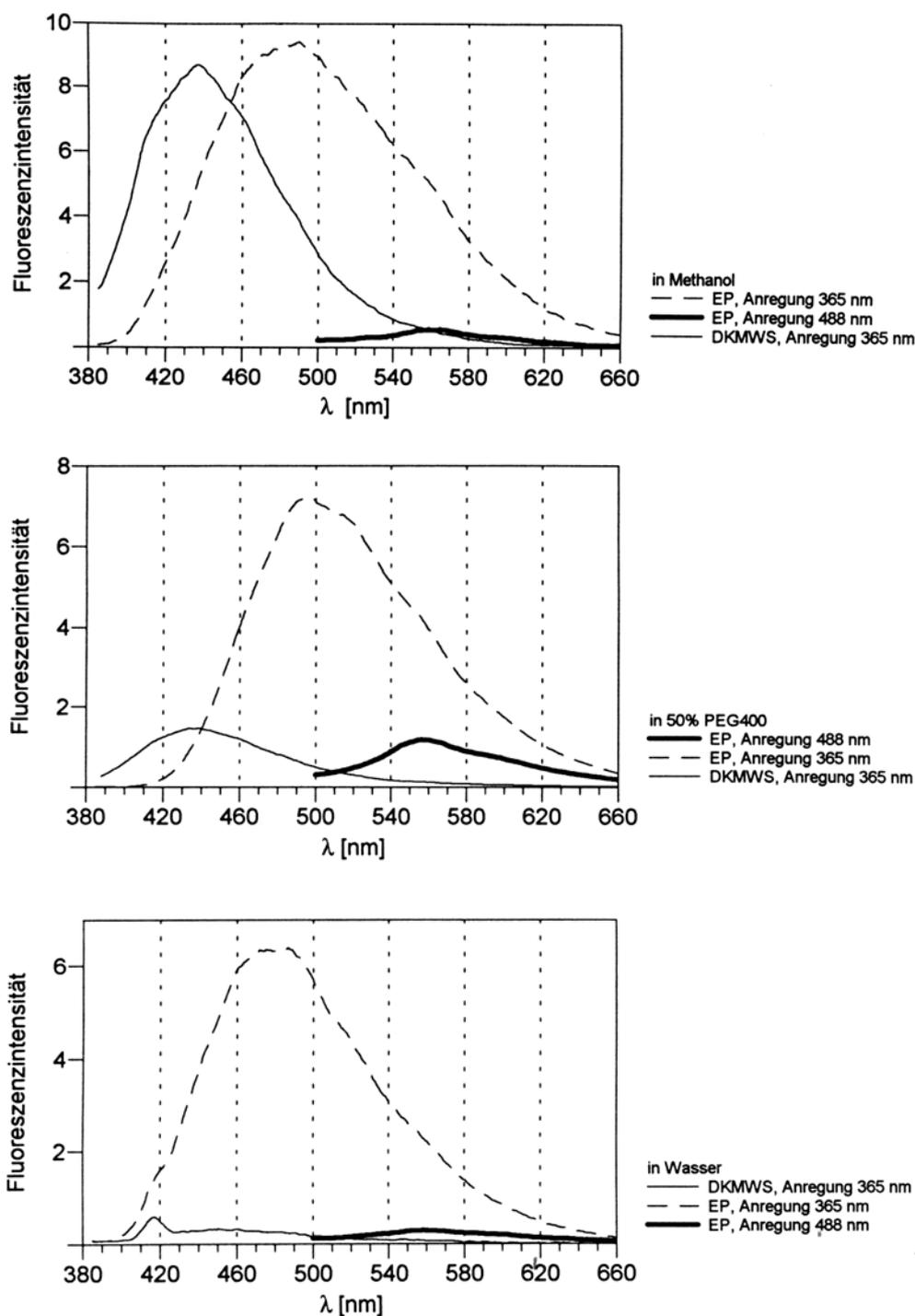


Abbildung 3.3-2: Vergleich der Fluoreszenzspektren von Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure (DKMWS) und Equisetum-pyron (EP) in drei Lösungsmitteln bei den Anregungswellenlängen 365 nm und 488 nm. Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure zeigte bei Anregung mit 488 nm keine Fluoreszenz (siehe Tabelle 3.3-1). Für die graphische Darstellung der Spektren wurde die Fluoreszenzintensität proportional zur eingestellten Konzentration umgerechnet.

Ergebnisse

Tabelle 3.3-1: Fluoreszenzspektroskopische Daten von Equisetumpyron und Dikaffeoyl-meso-weinsäure in verschiedenen Lösungsmitteln. FI: Fluoreszenzintensität, NA: Naturstoffreagenz A, (*): es wurde keine Messung durchgeführt.

Substanz Lösungsmittel	Konzentration	Anregung 365 nm			Anregung 488 nm		
		Emissions- Bereich	Maximum	FI	Emissions- bereich	Maximum	A
	[mg·mL ⁻¹]	[nm]	[nm]		[nm]	[nm]	
Equisetumpyron							
Methanol	0,016	390-700	500	90	540-640	560	5
50 % MeOH	0,016	390-680	500	(*)	540-640	560	4
10 % MeOH	0,016	400-680	490	70	-	-	0
Wasser	0,015	400-660	490	62	-	-	0
Wasser	1,80	(*)	(*)	(*)	520-660	560	36
50 %PEG 400	0,90	400-700	500	480	500-700	560	80
50 % Glycerin	0,45	400-700	480	270	500-680	(*)	(*)
+ 0,3 % NA in MeOH	(*)	(*)	545	(*)	(*)	595	(*)
Dikaffeoyl- meso-weinsäure							
Methanol	0,012	385-600	450	90	-	-	0
50 % MeOH	0,013	400-580	450	18	(*)	(*)	(*)
10 % MeOH	0,011	400-560	420/440	7	(*)	(*)	(*)
Wasser	0,011	410-560	419/460	6	(*)	(*)	(*)
Wasser	1,20	400-630	450	35	-	-	0
50 % PEG 400	0,060	385-600	445	120	-	-	0
50 % Glycerin	0,060	385-620	445	120	-	-	0
+ 0,3 % NA in MeOH	(*)	(*)	522	(*)	(*)	570	(*)
Methanolischer Extrakt aus Rhizomen von <i>E. arvense</i>	(*)	390-700	490	(*)	540-640	560	(*)

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Rhizomen und Prothallien von *Equisetum*

Rhizome und Prothallien von *Equisetum arvense* L. zeigten bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung charakteristische Emissionsmuster. Die beiden phenolischen Hauptinhaltsstoffgruppen der untersuchten Gewebe – Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate – lassen sich zur Autofluoreszenz anregen. Dadurch kann ihr Akkumulationsmuster im mikroskopischen Präparat dargestellt werden.

3.3.1.1.1.1 Methodik zur Interpretation der Emissionsmuster

1. Prinzip der selektiven Darstellung von zwei Stoffgruppen mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften

Betrachtet man ein mikroskopisches Präparat bei einer bestimmten Anregungswellenlänge in einem Emissionsbereich, in dem nur eine von beiden Komponenten fluoresziert, kann deren Akkumulationsverteilung im Gewebe selektiv dargestellt werden. Voraussetzung für die Interpretation von Emissionsmustern ist die Kenntnis des Fluoreszenzverhaltens der Stoffgruppe in den jeweiligen Einbettungsmedien der Präparate. Dazu wurde stellvertretend für die Styrylpyrone, die in den Rhizomen und Prothallien von *E. arvense* als Hauptkomponente akkumulierte Verbindung Equisetumpyron und als Vertreter der Hydroxyzimtsäurederivate bzw. Kaffeesäurederivate die in den betrachteten Geweben ebenfalls in höheren Mengen vorkommende Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die aufgezeichneten Fluoreszenzspektren wurden im vorherigen Abschnitt detailliert beschrieben. Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der genannten Substanzen und die daraufhin gewählten fluoreszenzmikroskopischen Parameter sollen kurz geschildert werden.

Equisetumpyron lässt sich mit Licht der Wellenlänge 488 nm zur Autofluoreszenz anregen, dagegen fluoresziert Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure bei dieser Wellenlänge nicht. Wird das mikroskopische Präparat mit dieser Wellenlänge mit dem Laser (Laser-Scanning-Mikroskopie, LSM) angeregt, kann die Verteilung der Styrylpyrone im betrachteten Gewebe selektiv dargestellt werden. Die Fluoreszenz, die z.B. bei Verwendung des Bandpassfilters 515-565 nm sichtbar wird, resultiert ausschließlich von der Autofluoreszenz der Styrylpyrone. Aufnahmen, die mit der konventionellen Technik gemacht wurden, liefern das gleiche Ergebnis. Hierzu wird im gleichen Spektralbereich mit Licht der Wellenlänge 460-500 nm angeregt, die Fluoreszenz im Bereich 510-560 nm aufgezeichnet.

Anders verhält es sich bei der Anregung der Präparate mit kürzerwelligem Licht. Bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 365 nm zeigen sowohl Equisetumpyron als auch Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure eine Autofluoreszenz. Im mikroskopischen Präparat fluoreszieren deshalb bei dieser Anregungswellenlänge beide Stoffgruppen. Die Spektren (Abbildung 3.3-3, Abbildung 3.3-1 und Abbildung 3.3-2) zeigen, dass Kaffeesäurederivate bei Betrachtung der Präparate im Emissionsbereich von 400-435 nm (LSM, Laser-Anregung

Ergebnisse

365 nm) bzw. im Emissionsbereich von 435-484 nm (konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, Anregung 340-380 nm) sichtbar gemacht werden können. Bei Anregung mit 365 nm überschneiden sich die Fluoreszenzspektren der Reinsubstanzen Equisetumpyron und Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure, zeigen aber deutlich unterschiedliche Maxima. Das heißt, bei den im Mikroskop zur Darstellung der Kaffeesäurederivate verwendeten Anregungswellenlängen fluoreszieren beide Stoffgruppen; beide betrachteten Emissionsbereiche liegen aber näher am Emissionsmaximum Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure als am Emissionsmaximum von Equisetumpyron. Die beobachtete Fluoreszenz bei diesen Aufnahmeparametern sollte deshalb stärker von Kaffeesäurederivate resultieren. Der bei der gleichen Laser-Anregung ebenfalls verwendete Emissionsbereich > 515 nm wird hingegen vor allem die Fluoreszenz der Styrylpyrone erfassen.

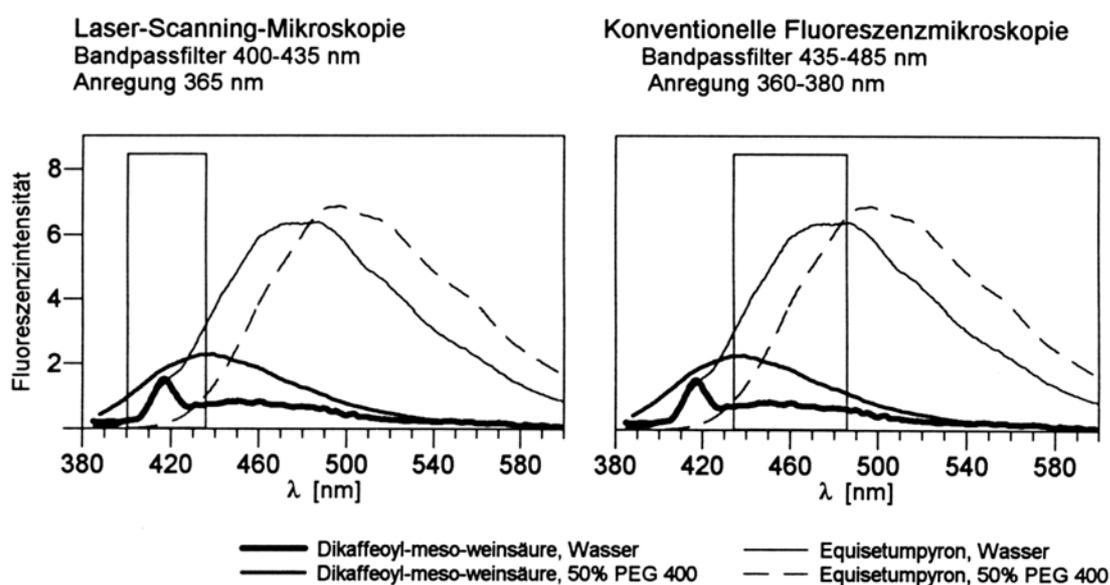


Abbildung 3.3-3: Vergleich von Fluoreszenzspektren der Reinsubstanzen und einzelner Emissionsbereiche der Fluoreszenzmikroskope. Dargestellt sind die Fluoreszenzspektren von Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure und Equisetumpyron in den Lösungsmitteln Wasser und 50 % PEG 400 bei Anregung mit 365 nm. Die bei gleicher Anregungswellenlänge (bzw. Bereich) bei den jeweiligen Fluoreszenzmikroskopen verwendeten Bandpassfilter sind als „Kasten“ schematisch zusätzlich abgebildet. Die Lage der Spektren und die der Emissionsbereiche geben an, welche der zugehörigen Stoffgruppen bei gleicher Anregung im mikroskopischen Präparat in diesen Emissionsbereichen stärker fluoreszieren.

Eine genauere Interpretation der Emissionsmuster eines Präparates ermöglicht der Vergleich der einzelnen Emissionsbereiche bei verschiedenen Anregungswellenlängen. Da sich Kaffeesäurederivate nur im UV-Bereich anregen lassen, während Styrylpyrone auch mit längewelligem Licht angeregt werden können, deutet eine Fluoreszenz, die in Gewebereichen nur oder verstärkt bei kurzweiliger Anregung (LSM, Laseranregung 365 nm) im Emissionsbereich von 400-435 nm auftritt auf Kaffeesäurederivate hin. Eine Fluoreszenz bei kurz- und langweiliger Anregung (LSM, Laser-Anregung 365 und 488 nm) zeigt dagegen die Verteilung der Styrylpyrone. Ein Beispiel geben die Aufnahmen in Abbildung 3.3-6 eines

Rhizomquerschnittes von *E. arvense*. Bei langwelliger Anregung (Laser-Anregung 488 nm) fluoreszieren in beiden betrachteten Emissionsbereichen die Randbereiche des Querschnittes stärker, ebenso bei der kurzwelligen Anregung (Laser-Anregung 365 nm) im Emissionsbereich > 515 nm. Die Emissionsmuster dieser Bereiche weisen hier also auf das Verteilungsmuster der Styrylpyrone im Querschnitt hin. Bei Betrachtung im Emissionsbereich von 400-435 nm treten nach Anregung mit 365 nm die Zellen des Zentralzylinders gegenüber den Randzellen heller hervor, was als höhere Akkumulation von Kaffeesäurederivaten in diesem Kompartiment gedeutet werden kann.

2. Voraussetzung zur Identifikation der Stoffgruppen

Für die eindeutige Identifizierung der Stoffgruppen im mikroskopischen Präparat sollten folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- a) Die ausgewählte Reinsubstanz muss die gleichen Fluoreszenzeigenschaften aufweisen wie alle Vertreter dieser Stoffgruppe, die im untersuchten Präparat enthalten sind.
- b) Das Fluoreszenzverhalten der Reinsubstanz in Lösung darf sich nicht von dem der Substanz unterscheiden, wenn sie möglicherweise an die Zellwand assoziiert oder kovalent gebunden ist.
- c) Gemische der Stoffgruppen dürfen sich nicht gegenseitig beeinflussen.
- d) Im Gewebe dürfen keine anderen Substanzen vorliegen, die im gleichen Emissionsbereich wie die relevanten Stoffgruppen fluoreszieren

Alle hier aufgezählten Voraussetzungen werden nicht vollständig erfüllt, bzw. konnten bisher nicht nachgeprüft werden. Zu Punkt a) muss angemerkt werden, dass in den betrachteten Geweben die Stoffgruppe der Hydroxymethylsäurederivate fast ausschließlich von verschiedenen Kaffeesäurederivaten gebildet wird. Deshalb wurde auf die spektrale Analyse anderer Hydroxymethylsäurederivate, wie Konjugaten der *p*-Cumarsäure verzichtet. Die hier beschriebene Gruppe der Kaffeesäurederivate vertritt daher im Rahmen der vorliegenden Betrachtungen die Gruppe der Hydroxymethylsäurederivate. Insbesondere zu Punkt c) müssen Einschränkungen in Kauf genommen werden. Es muss beachtet werden, dass das von Kaffeesäurederivaten emittierte Fluoreszenzlicht durch die im Gewebe gleichzeitig vorliegenden Styrylpyrone abgeschwächt werden kann, da bei Anregung im kurzwelligen Bereich (365 nm bzw. 340-380 nm) der Emissionsbereich der Kaffeesäurederivate im Absorptionsbereich der Styrylpyrone liegt (siehe Abbildung 3.3-4, Abbildung 3.3-3 und Abbildung 3.3-2). Genaue Aussagen über Emissions- und Akkumulationsmuster von Substanzen, wenn sie gemeinsam vorliegen, lassen sich immer nur für die im längerwelligen Lichtbereich absorbierenden Komponenten machen. Dieser Maskierungseffekt durch die Styrylpyrone schränkt die Aussagen zur Verteilung von Kaffeesäurederivaten im Gewebe ein. Durch das Fehlen einer kurzwelligen Fluoreszenz (400-435 nm) kann daher das Vorhandensein von Kaffeesäurederivaten nicht ausgeschlossen werden. An Gewebereichen, wo nach Anregung bei 365 nm eine geringere Emission im längerwelligen Bereich (515-565 nm) als im kürzerwelligen Bereich (400-435 nm) auftritt, scheint die Akkumulation von Kaffeesäurederivaten bestätigt.

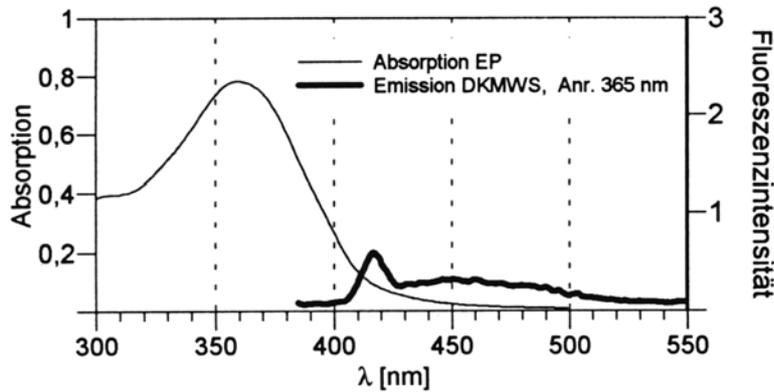


Abbildung 3.3-4. Vergleich des Absorptionsspektrums von Equisetumpyron mit dem Fluoreszenzspektrum von Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure in Wasser. Der Wellenlängenbereich der Fluoreszenz der Säure liegt teilweise im Absorptionsbereich des Styrylpyrons.

3.3.1.1.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmetechnik

1. Aufnahmeparameter beider fluoreszenzmikroskopischer Techniken

Bei Aufnahmen mit der LSM-Technik wurden die Präparate mit dem Laser bei zwei Wellenlängen angeregt, die Emission in mehreren Wellenlängenbereichen aufgezeichnet. Aufnahmen mit der konventionellen Technik erfolgten nach Anregung der Objekte mit Licht von drei Spektralbereichen. Die Emission der Präparate wurde, konventionell angeregt, jeweils in einem festgelegten Spektralbereich aufgezeichnet. Zur Übersicht sind die verwendeten Anregungswellenlängen und die zugehörigen Emissionsbereiche beider Techniken für die Aufnahmen, die im folgenden beschrieben werden tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 3.3-2 und Tabelle 2.4.4). Die Aufnahmeparameter sind jeweils in den Legenden der Abbildungen zusätzlich vermerkt.

Ergebnisse

Tabelle 3.3-2: Aufnahmeparameter beider fluoreszenzmikroskopischer Techniken am Axiovert-100 mit Angabe der jeweiligen Bildschirmkanäle für Farbdarstellungen. Die rechte Spalte gibt an welche Stoffgruppe im Präparat jeweils spezifiziert werden soll.

Technik	Anregung [nm]	Emission [nm]	Bildschirmkanal in Farb-Darstellungen	Hinweis auf Stoffgruppe
LSM	365	400-435	blau	Kaffeesäureester
		> 515	-	Styrylpyrone
	488	515-565	grün	Styrylpyrone
		> 590	rot	
konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie	340-380	435-485	blau	Kaffeesäureester
	460-500	510-560	grün	Styrylpyrone
	510-560	673-648	rot	

2. Darstellungstechnik – Möglichkeiten der Bildverarbeitungsprogramme

Die Emission der Präparate wurde bei beiden Techniken digital aufgezeichnet. Jeder Emissionsbereich kann separat als Graustufenbild am Bildschirm dargestellt werden. Um die Spektralbereiche der aufgezeichneten Fluoreszenz zu veranschaulichen, wurden die Emissionsbereiche einzelnen Bildschirmfarben zugeordnet. In Anlehnung an die jeweiligen Spektralfarben wurden die Farben blau für den kürzerwelligen Emissionsbereich 400-435 nm bzw. 435-485 nm, grün für die Emissionsbereiche 515-565 nm bzw. 510-560 nm und rot für die langwelligen Bereiche > 590 nm bzw. 573-648 nm gewählt. Durch Übereinanderprojektion der Farbkanäle können die Emissionsbereiche gemeinsam dargestellt werden. Mischöne wie z.B. gelb entstehen dabei durch additive Farbmischung der Grundfarbe des Monitors und gehen daher in der erscheinenden Farbqualität in den Abbildungen nicht direkt vom Objekt aus. Durch kombinierte Farbdarstellung digital aufgezeichneter Emissionsbereiche kann ein Bildeindruck entstehen, der dem Emissionsmuster spektraler Farben ähnlich ist. Beispiele geben die Aufnahmen der Rhizomquerschnitte von *E. arvense* L. und *E. sylvaticum* L. (Abbildung 3.3-9 **Error! Reference source not found.**). Der Vergleich mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, in denen direkt die emittierte Strahlung fotografisch festgehalten wurde, zeigen die Übereinstimmungen zu dieser Art der Darstellungstechnik (Abbildung 3.3-5).

Ebenso zeigen die Abbildungen, dass die digitalen Aufnahmen, die mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie erzeugt wurden, prinzipiell die gleichen Resultate liefern wie die, die mit der LSM-Technik aufgenommen wurden. Beispielsweise fluoresziert der

Rhizomquerschnitt von *E. arvense* in Abbildung 3.3-9 im Emissionsbereich 510-560 nm (dargestellt durch die Farbe grün) stark in äußeren Bereichen des Rindenparenchyms (Anregung mit 460-500 nm). Das gleiche kann für die Fluoreszenz, betrachtet im Emissionsbereich 515-565 nm (Laser-Anregung mit 488 nm) beobachtet werden (Abbildung 3.3-6).

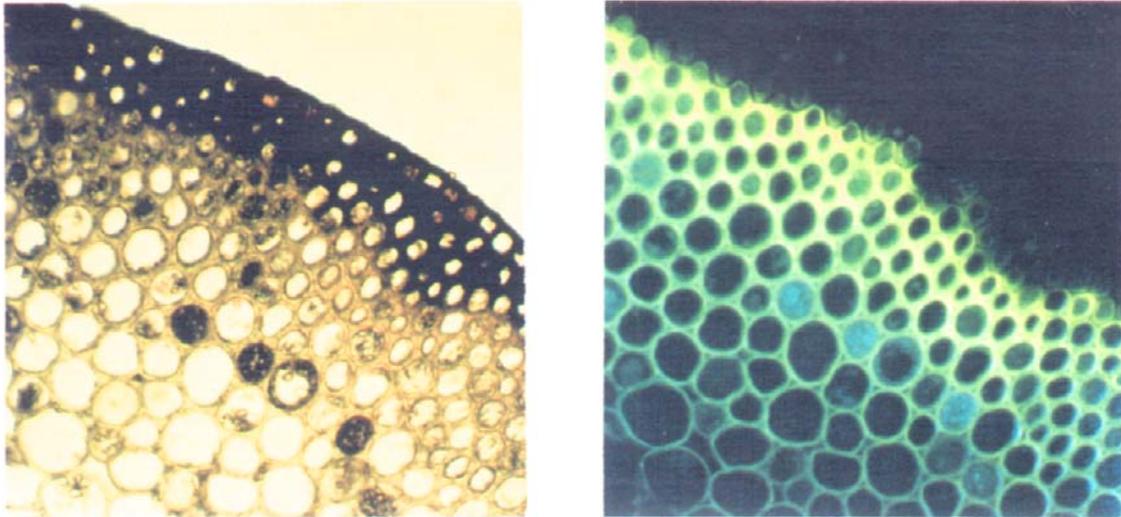


Abbildung 3.3-5: Querschnitt durch ein Rhizom von *Equisetum arvense* L. bei Durchlichtbetrachtung und konventioneller Fluoreszenzanregung. Direkte fotografische Aufnahmen (Ortholux II). Anregung 340-380 nm; Emission >430 nm.

Bei kombinierter Darstellung der verschiedenen Emissionsbereichen bleiben durch die unterschiedliche Farbgebung der einzelnen Kanäle die Informationen eines Emissionsbereiches erhalten. Durch entsprechende Bildverarbeitungssoftware können einzelne Farbkanäle nachträglich wieder aus der Farbdarstellung entfernt oder abgeschwächt werden. Die Farbintensität der einzelnen Farben in der mehrfarbigen Darstellung entspricht Graustufen der ursprünglichen Signale der einzelnen Kanäle. Die Einzelfarbkanäle können erneut in Graustufen umgewandelt werden. Auf diese Weise kann die Fluoreszenz der Gewebe in den einzelnen Emissionsbereichen nebeneinander getrennt betrachtet werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.3-10 zu sehen. Während Abbildung 3.3-10 / 4 Die Fluoreszenz aller drei Kanäle zusammen zeigt, ist in Abbildung 3.3-10 / 1 - Abbildung 3.3-10 / 3 nur die Fluoreszenz gezeigt, die jeweils einem Kanal entspricht. Hier wird deutlich, dass die in einer Farbe erscheinende Fluoreszenz in der Farbdarstellung sich aus der Fluoreszenz zusammensetzt, die in mehreren Emissionsbereichen aufgezeichnet wurde.

3. Möglicher Einfluss des Einbettungsmediums und der Präparationstechnik auf die Fluoreszenzmuster

Frischpräparate von Querschnitten durch Rhizome von *E. arvense* wurden in den zwei Einbettungsmedien Wasser und 50 % aq. PEG 400 bei Laser-Anregung mikroskopiert (Abbildung 3.3-6). An beiden Emissionsmustern konnten keine auffälligen Unterschiede beobachtet werden. Auch das Dauerpräparat eines Rhizomquerschnittes von *E. arvense* unterscheidet sich hinsichtlich der Fluoreszenz nicht wesentlich von denen der Frischpräparate. Lediglich die Epidermis und die hypodermalen Schichten bei Betrachtung mit dem Langpassfilter (> 590 nm) fluoreszieren etwas stärker bei dem Dauerpräparat als bei den Frischpräparaten. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen an Prothallienpräparaten. Während an Dünnschnitten, in Harz eingebetteter Gewebe eine deutliche Fluoreszenz in Zellwänden auftrat, zeigten Frischpräparate nur eine schwache Wandfluoreszenz (Abbildung 3.3-14 und Abbildung 3.3-15).

Beobachtungen an den Geweben

1. Emissionsmustersvergleich eines Querschnittes durch ein Rhizom von *Equisetum arvense*

Rhizome von *E. arvense* zeigten über den ganzen Querschnitt eine Autofluoreszenz der Zellen. Im Fluoreszenzlicht waren dadurch alle anatomischen Strukturen sichtbar. Werden nach Anregung mit 365 und 488 nm (LSM, Laser Anregung) die Aufnahmen der einzelnen Emissionsbereiche verglichen (Abbildung 3.3-7), fällt eine inhomogene Verteilung der Fluoreszenzintensitäten auf, die im folgenden für die verschiedenen Gewebe im Querschnitt beschrieben werden.

Im Rindenparenchym war in allen betrachteten Emissionsbereichen die Fluoreszenzintensität der äußeren Zelllagen höher als die der inneren Zellschichten. Am deutlichsten wird das in der Darstellung des Emissionsbereiches > 515 nm (Anregung 365 nm) (siehe Abbildung 3.3-7 / 2a). Die Epidermis mit den darunterliegenden hypodermalen Schichten ist nur bei Betrachtung im Emissionsbereich > 590 nm (Anregung 488 nm) durch eine deutlich sichtbare Autofluoreszenz zu erkennen (Abbildung 3.3-7 / 1a). Diese typische, in Durchlichtbetrachtung braun pigmentierte Rindenzone der Rhizome ist deutlich von den übrigen Zellen des Rindenparenchyms unterscheidbar. (siehe Abbildung 3.3-5). An der Endodermis ist in allen betrachteten Emissionsbereichen die stärkere Fluoreszenz der Endodermisleisten charakteristisch. Die Zellen des Zentralzylinders fluoreszieren ebenfalls in allen Emissionsbereichen. Im Vergleich zu den Zellen des Rindenparenchyms ist die Fluoreszenzintensität nach kurzweiliger Anregung (365 nm) bei Betrachtung im Emissionsbereich von 400-435 nm stärker (siehe Abbildung 3.3-7 2b). In ihrer Fluoreszenzintensität heben sich Zellen des Xylems (Tracheiden) von den übrigen Zellen des Zentralzylinders ab, besonders deutlich bei Betrachtung im Emissionsbereich von 400-435 nm (Anregung 365 nm). Tracheiden zeigen als einziger Zelltyp in Schachtelhalmen eine positive Reaktion mit klassischen Ligninreagenzien wie Phloroglucin / HCl (MEUSEL 1971).

2. Emissionsmuster eines Querschnittes aus dem Apikalbereich eines Rhizoms von *Equisetum arvense* L.

Inhaltstoffuntersuchungen von Geweben der Wachstumsspitzen von Rhizomen zeigten einen bis zu fünffach höheren Gehalt löslicher Phenole als in älteren Rhizomen. Diese Gewebe sind noch nicht völlig ausdifferenziert, was im mikroskopischen Bild gut zu erkennen ist. In Abbildung 3.3-8 sind die Fluoreszenzmuster eines solchen Querschnittes in verschiedenen Bereichen dargestellt (Laser Anregung 365 und 488 nm). Die bei älteren völlig differenzierten Gewebe beobachteten Fluoreszenzmerkmale einzelner Zelltypen (z.B. Endodermisleisten) fehlten hier. Statt dessen ist in den betrachteten Emissionsbereichen eine homogene Verteilung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Die im Emissionsbereich von 400-435 nm (Anregung 365 nm) gemessene Intensität reichte für eine Darstellung des Zellmusters im Fluoreszenzlicht nicht aus. Das als Dauerpräparat untersuchte Gewebe zeigte damit keine deutliche Emission, die auf eine Akkumulation von Kaffeesäurederivaten hinweist, obwohl HPLC-Untersuchungen in diesem Gewebetyp größere Mengen dieser Stoffgruppen zu finden waren.

3. Interspezifische Unterschiede der Emissionsmuster von Rhizomquerschnitten

In den Untersuchungen zur Akkumulation löslicher Inhaltsstoffe in Rhizomen ergaben sich bei den einzelnen Arten zum Teil deutliche Unterschiede. Daher schien ein fluoreszenzmikroskopischer Vergleich zweier Arten interessant, deren Inhaltsstoffmuster starke Abweichungen zeigte. Rhizome von *Equisetum sylvaticum* wiesen im Vergleich zu *E. arvense* einen deutlich geringeren Gehalt an Styrylpyronen, aber höheren Gehalt an Hydroxymitsäurederivaten auf. Aufnahmen von Rhizomquerschnitten von *E. sylvaticum* wurden daher Aufnahmen von *E. arvense* gegenübergestellt (siehe Abbildung 3.3-9).

Beim Vergleich der Emissionsmuster der Schnitte fällt auf, dass *E. sylvaticum* im grün dargestellten Emissionsbereich (510-560 nm), Anregung 460-500 nm, fast nur im Bereich des Zentralzylinders fluoresziert. Hier fluoreszieren ausschließlich die parenchymatischen Zellen. Die Zellen der Leitbündel fluoreszieren dagegen nicht. Bei *E. sylvaticum* ist die Fluoreszenz in diesem Emissionsbereich im Rindenparenchym im Gegensatz zu Rhizomquerschnitten von *E. arvense* schwächer ausgeprägt. Übereinstimmungen im Fluoreszenzmuster mit *E. arvense* lassen sich z.B. im kürzerwelligen Emissionsbereich im Gewebebereich des Zentralzylinders finden. Das wird deutlich in Einzelkanaldarstellungen der Emissionsbereiche. Ein Ausschnitt der Aufnahme von *E. sylvaticum* ist in Abbildung 3.3-10 gezeigt. Hier können die in Graustufen einzeln abgebildeten Emissionsbereiche mit der Farbdarstellung verglichen werden. Die Bilder zeigen, dass sich die grün dargestellte Fluoreszenz der Bereiche des Zentralzylinders aus einer kürzerwelligen Emission (435-485 nm) und der Emission im Bereich von 510-560 nm zusammensetzt, während eine langwellige Fluoreszenz (573-648 nm) nicht auftrat.

4. Betrachtung zur zellulären Kompartimentierung an Längs - und Querschnitten

Bisher wurden die Emissionsmuster auf Gewebeebene verglichen. Indem man Einzelzellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht, lassen sich auch Aussagen zur zellulären Lokalisation der Inhaltsstoffe machen, was im folgenden dargestellt werden soll.

An Rhizomquerschnitten von *E. arvense* ist deutlich zu erkennen, dass Zellwände fluoreszieren. Bei manchen Querschnitten ist aber auch eine Fluoreszenz im Bereich der Zellumen zu beobachten. Betrachtet man z. B. den Bereich des Lumens von Abbildung 3.3-11, so fällt auf, dass die Fluoreszenz vor allem im blau dargestellten Emissionsbereich (435-485 nm, Anregung 340-380 nm) auftrat. Da die parenchymatischen Zellen der Rhizomen tangential gestreckt sind, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass bei der Anfertigung von Querschnitten Zellen zerstört werden und der Protoplast ausläuft. Dadurch kann es bei dieser Schnitttechnik zu einer reversiblen oder möglicherweise irreversiblen Ein- oder Anlagerung von ursprünglich vakuolär gespeicherten Inhaltsstoffen in die Zellwand kommen. Diese Problematik wird bei der Präparation von Längsschnitten umgangen. Die zelluläre Kompartimentierung bleibt dabei weitgehend erhalten. Abbildung 3.3-11 zeigt, dass die Verteilungsmuster der Fluoreszenzintensitäten eines Querschnittes denen eines Längsschnittes prinzipiell gleichen. Die Fluoreszenz, die in den Zellwänden auftrat kann folglich nicht als Artefakt angesehen werden. Durch Plasmolyse kann nachgewiesen werden, dass es sich um Zellen mit intakten Protoplasten handelt. Die Aufnahmen des Längsschnittes mit plasmolysierten Protoplasten (Abbildung 3.3-13) zeigen eine Fluoreszenz im Bereich der Vakuole und belegen damit die vakuoläre Speicherung sekundärer Inhaltsstoffe in diesen Geweben. Im Gegensatz zum Längsschnitt mit nicht plasmolysierten Zellen (Abbildung 3.3-13 / 1) wird an dem Schnitt, dessen Protoplasten sich von der Zellwand gelöst haben (Abbildung 3.3-13 / 2a) deutlich sichtbar, dass die Fluoreszenz sowohl im Bereich der Vakuole als auch in Zellwänden auftritt. Während die Blau dargestellte Fluoreszenz (435-485 nm, Anregung 340-380 nm) im Lumen und in Wänden gleichermaßen auftrat, ist die Emission im Bereich von 510-560 nm (Anregung 460-500 nm) in Zellwänden in den Randbereichen des Schnittes stärker. Dieser grün dargestellte Emissionsbereich entspricht dem Bereich, indem Styrylpyrone selektiv angeregt werden können, während im blau dargestellten Emissionsbereich beide Stoffgruppen fluoreszieren. Bemerkenswert ist auch die in den Zellen gespeicherte Stärke, die hier sichtbar wird, wobei die Stärkekörner selbst zu fluoreszieren scheinen. Derselbe Schnitt nach Anregung mit dem Laser (365 nm) betrachtet, zeigt dass die Fluoreszenz der Zellstrukturen mit den Beobachtungen der konventionell erzeugten Aufnahmen übereinstimmt. Aufgenommen wurden Emission in drei Spektralbereichen. Vakuolen und Wände erscheinen daher in der Farbdarstellung orange bis rosa. Auch die im kürzerwelligen Bereich von 400-435 nm separat abgebildete Emission (Abbildung 3.3-13 2d) zeigt das gleiche Muster.

In Abschnitt 3.2.3 wurden die Ergebnisse Analyse unlöslicher Bestandteile der Zellwand beschrieben. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen können hierzu wichtige Informationen liefern. Abbildung 3.3-12 zeigt einen Rhizomquerschnitt von *E. arvense*, der selbst nach Extraktion mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität und nach Behandlung mit

Alkali eine Fluoreszenz im Bereich der Zellwand aufweist. Auch das Emissionsmuster der Zellwände entspricht in den dargestellten Strukturen etwa dem eines Frischpräparates.

5. Prothallien von *Equisetum arvense* L.

Das Muster der phenolischen Inhaltsstoffe von Prothallien entspricht etwa dem von Rhizomen (Abschnitt 3.2.1). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Prothallienpräparaten sollten zeigen, wie die Inhaltsstoffe in diesen Geweben verteilt sind.

An einem Frischpräparat eines Prothalliums von *E. arvense* (Abbildung 3.3-14) (Laser Anregung 488 nm) sind neben fluoreszierenden Chloroplasten auch fluoreszierende Zellwände beobachtbar. Die Wandfluoreszenz ist jedoch erheblich schwächer als bei Rhizompräparaten. Mit diesem Gewebe wurde ebenfalls zur genaueren Darstellung der Kompartimentierung eine Plasmolyse durchgeführt. An der vergrößert dargestellten Einzelzelle (Abbildung 3.3-14 / 3) wird die Vakuole deutlich sichtbar. Die EinzelkanalDarstellungen (Abbildung 3.3-14 / 3a, b) zeigen, dass die Fluoreszenz der Vakuole im Emissionsbereich von 515-565 nm stärker ist als im Bereich > 590 nm. Im Vergleich mit der Transmissionsaufnahme (Abbildung 3.3-14 / 1 und Abbildung 3.3-14 / 2) ist erkennbar, dass dunkel pigmentierte Zellen dieses Gewebes nicht fluoreszieren.

In Harz eingebettete Prothallienschnitte von *E. arvense* (Abbildung 3.3-15) wurden bei gleichen Aufnahmeparametern mikroskopiert wie die Frischpräparate der Prothallien. Dargestellt sind zwei Schnitte, wobei das Gewebe in Abbildung 3.3-15 / 2a aus „älteren“, bräunlich verfärbten Geweben eines Prothalliums stammte. Bei Durchlichtbetrachtung zeigte dieser Schnitt in Zellwänden eine schwache gelbbraune Färbung. Der andere Schnitt (Abbildung 3.3-15 / 1) hingegen stammte von den grünen „jüngeren“ Bereichen des selben Prothalliums und wies in den Zellwänden bei Durchlichtbetrachtung keinerlei Pigmentierung auf. In beiden Aufnahmen fluoreszieren die Zellwände, wobei die Wandfluoreszenz des Schnittes in Abbildung 3.3-15 / 2a etwas stärker ist. Die Zellwandfluoreszenz tritt in den Emissionsbereichen 515-565 nm und > 590 nm gleichermaßen auf, was die EinzelkanalDarstellungen der Aufnahme vom Schnitt in Abbildung 3.3-15 / 2b, 2c zeigen. Diese Wandfluoreszenz steht in gewissem Gegensatz zu den Beobachtungen an den Frischpräparaten der Prothallien. In beiden Aufnahmen der Dauerpräparate sind gleichzeitig Antheridien (A) mit Spermatozoiden zu sehen.

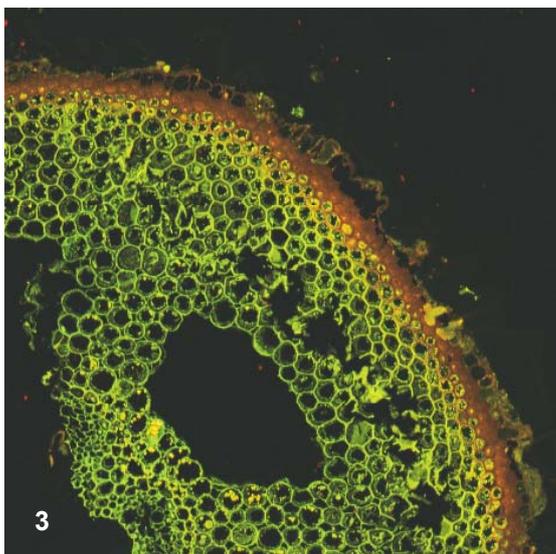
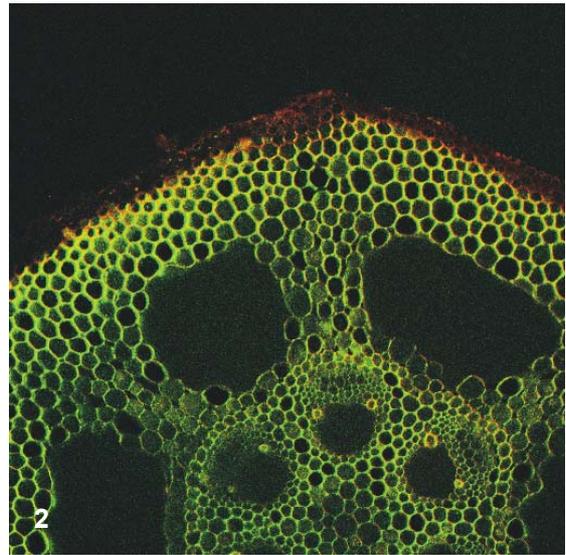
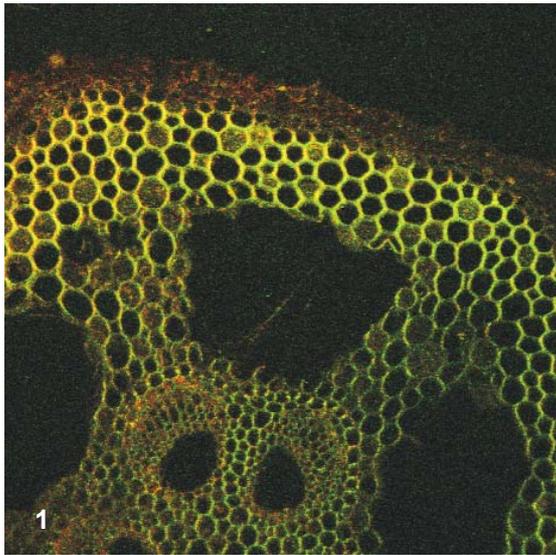


Abbildung 3.3-6: Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Rhizomquerschnitte von *Equisetum arvense* L.. Vergleich unterschiedlicher Einbettungsmedien und Präparationstechniken.

- 1 Frischpräparat (Handschnitt), Wasser
- 2 Frischpräparat (Handschnitt), 50 % PEG 400
- 3 Dauerpräparat (Dünnschnitt), Harzeinbettung

Bilderzeugung mit LSM, gemeinsame Darstellung der beiden Emissionsbereiche durch die Farben rot und grün.

Aufnahmeparameter:

Farbe	Anregung	Emission
grün	488 nm	515-565 nm
rot	488 nm	>590 nm

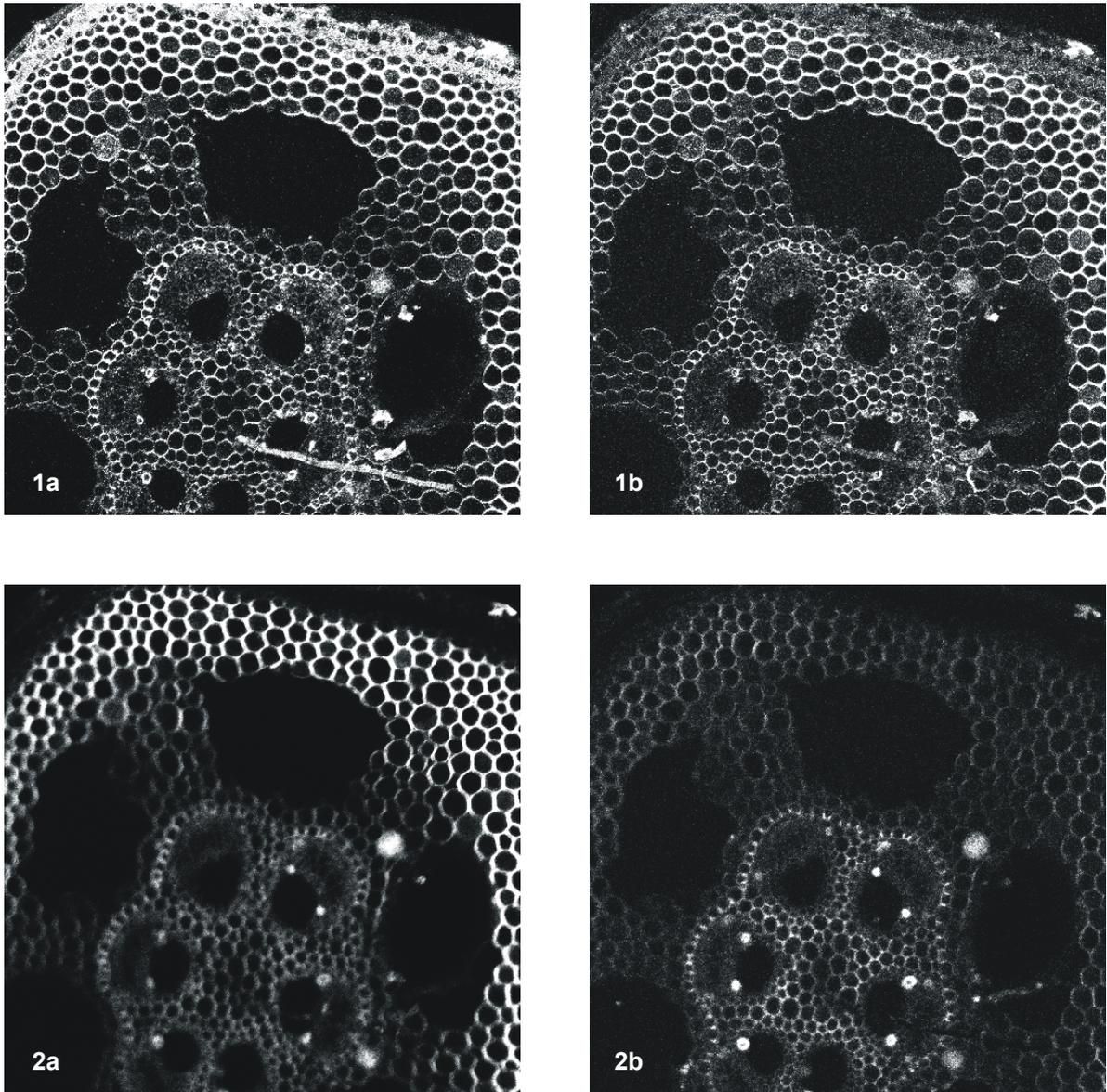


Abbildung 3.3-7: Verteilungsmuster der Lichtemission in einem Rhizomquerschnitt von *Equisetum arvense* L. (Frischpräparat, Wasser) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Bilderzeugung mit LSM.

Aufnahmeparameter:

Aufnahme	Anregung	Emission
1a	488 nm	> 590 nm
1b	488 nm	515-565 nm
2a	365 nm	> 515 nm
2b	365 nm	400-435 nm

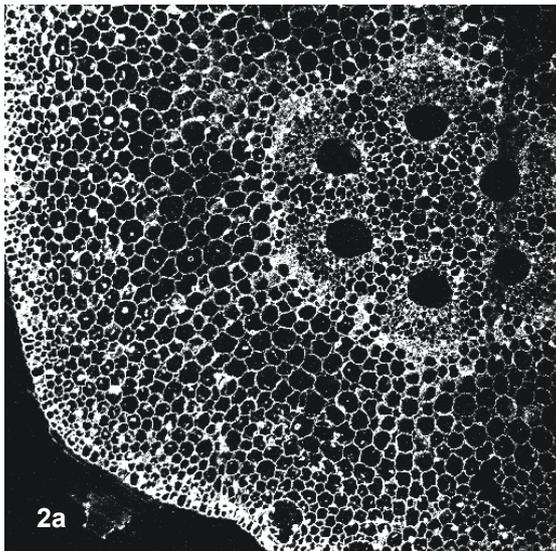
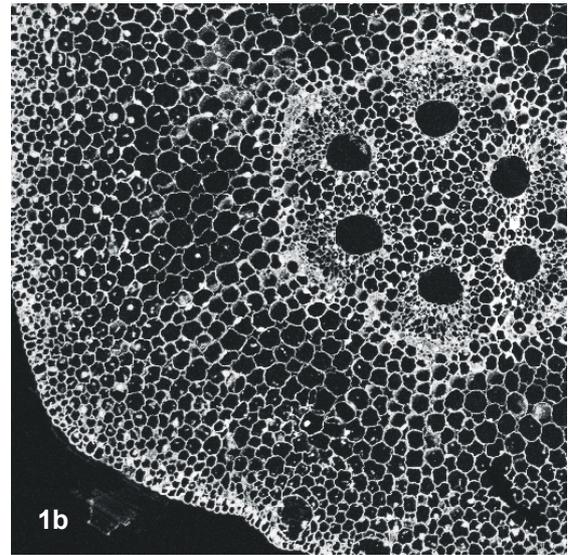
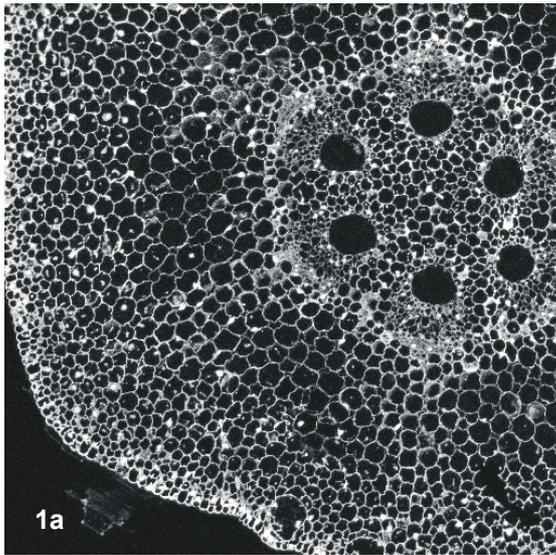
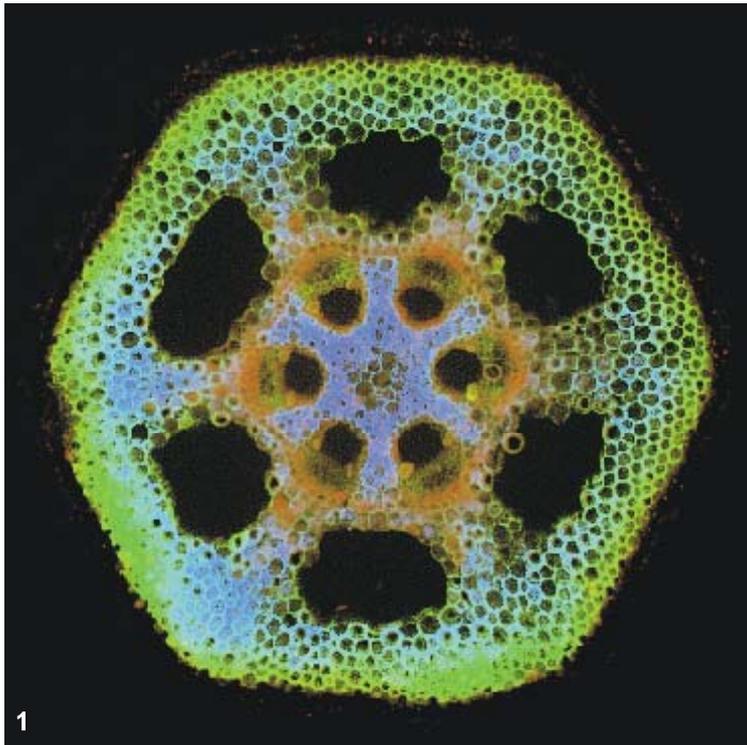


Abbildung 3.3-8: Verteilungsmuster der Lichtemission in einem Querschnitt durch den Apikalbereich eines Rhizoms von *Equisetum arvense* L. (Dauerpräparat, Harzeinbettung) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Bilderzeugung mit LSM.

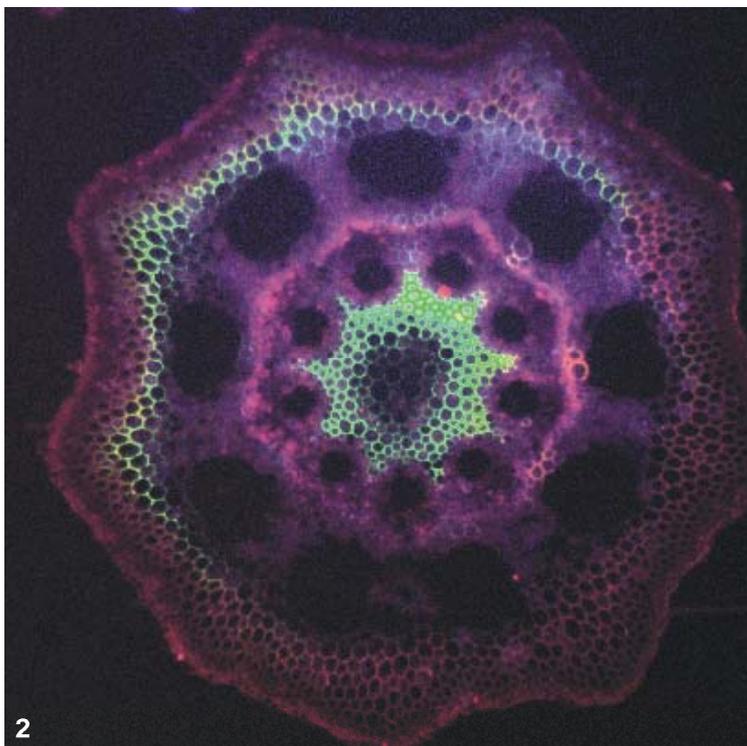
Aufnahmeparameter:

Aufnahme	Anregung	Emission
1a	488 nm	> 590 nm
1b	488 nm	515-565 nm
2a	365 nm	> 515 nm



E. arvense

Rhizom



E. sylvaticum

Rhizom

Aufnahmeparameter:

Farbe	Anregung	Emission
blau	340-380 nm	435-485 nm
grün	460-500 nm	510-560 nm
rot	510-560 nm	573-648 nm

Abbildung 3.3-9: Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen von Rhizomquerschnitten der Arten *Equisetum arvense* L. (1) und *Equisetum sylvaticum* L. (2) (Frischpräparate, 50 % PEG 400). Bilderzeugung mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie. Gemeinsame Darstellung der drei Emissionsbereiche durch die Farben blau, grün und rot.

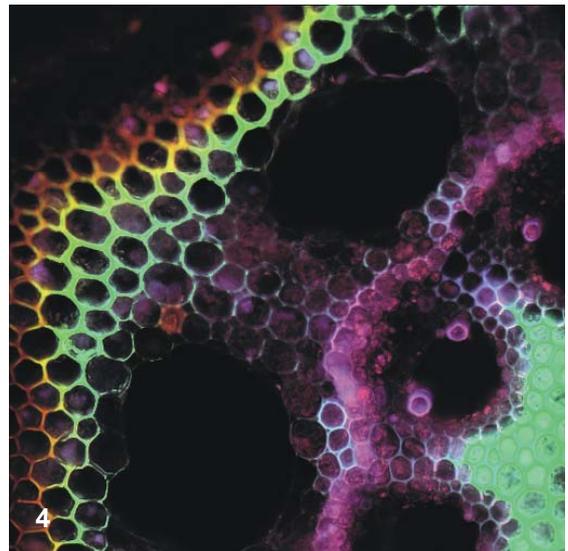
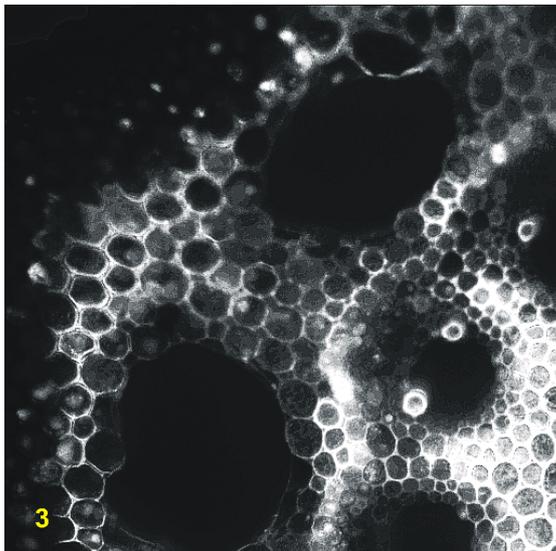
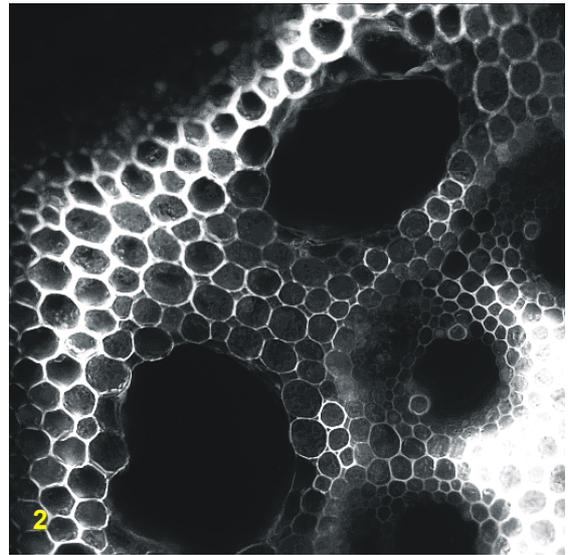
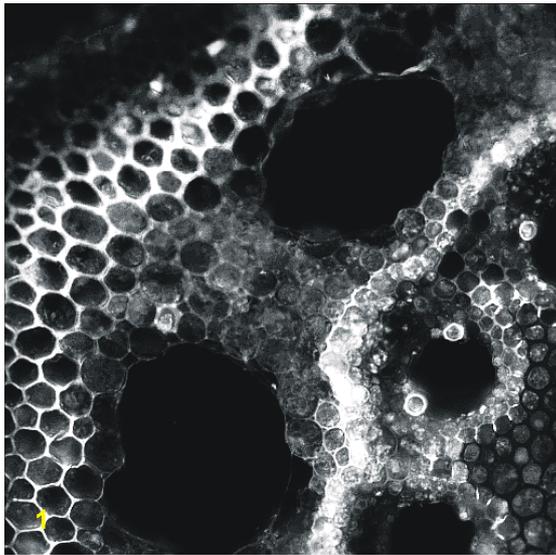


Abbildung 3.3-10: Verteilungsmuster der Lichtemission eines Rhizomquerschnittes von *Equisetum sylvaticum* L. (Frischpräparat, 50 % PEG 400) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängenbereichen. Bilderzeugung mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie.

Aufnahmeparameter:

Aufnahme	Anregung	Emission
1	510-560 nm (R)	573-648 nm
2	460-500 nm (G)	510-560 nm
3	340-380 nm (B)	435-485 nm
4	Gemeinsame Darstellung der drei Emissionsbereiche durch die Farben rot (R), grün (G) und blau (B).	

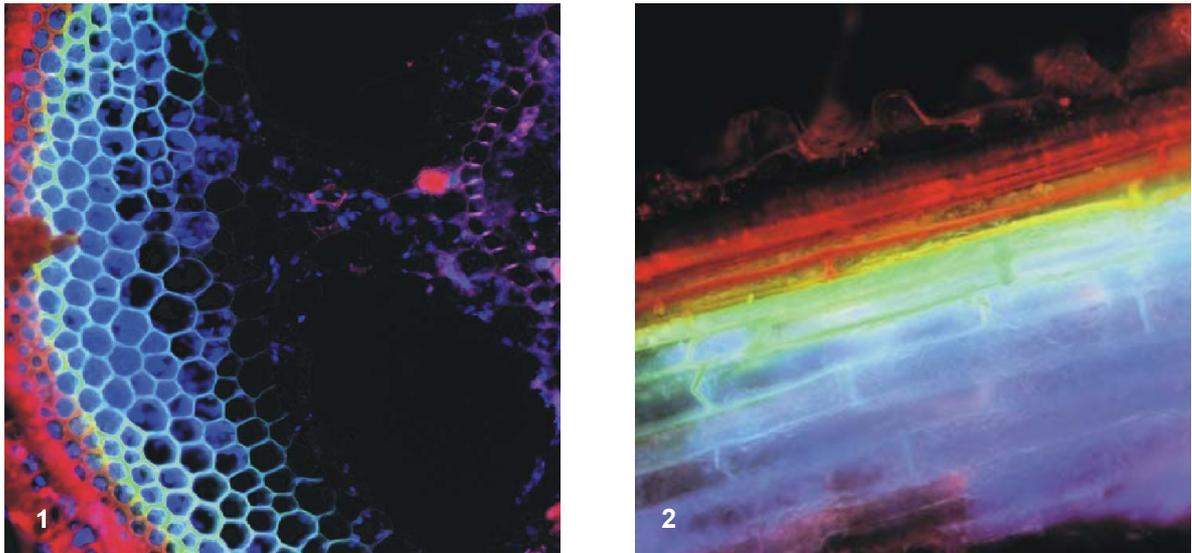


Abbildung 3.3-11: Querschnitt (1) und Längsschnitt (2) durch ein Rhizom von *Equisetum arvense* L. (Frischpräparate, 50 % PEG 400). Bilderzeugung mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie. Gemeinsame Darstellung der Emissionsbereiche durch die Farben rot, grün und blau.

Aufnahmeparameter:

Farbe	Anregung	Emission
blau	340-380 nm	435-485 nm
grün	460-500 nm	510-560 nm
rot	510-560 nm	573-648 nm

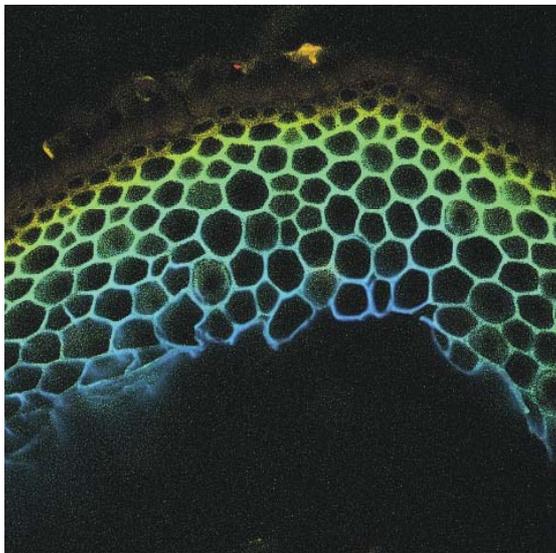


Abbildung 3.3-12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rhizomquerschnittes von *Equisetum arvense* L. (Wasser) nach Extraktion und Alkalibehandlung. Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie.

Aufnahmeparameter: siehe Abbildung 3.3-11.

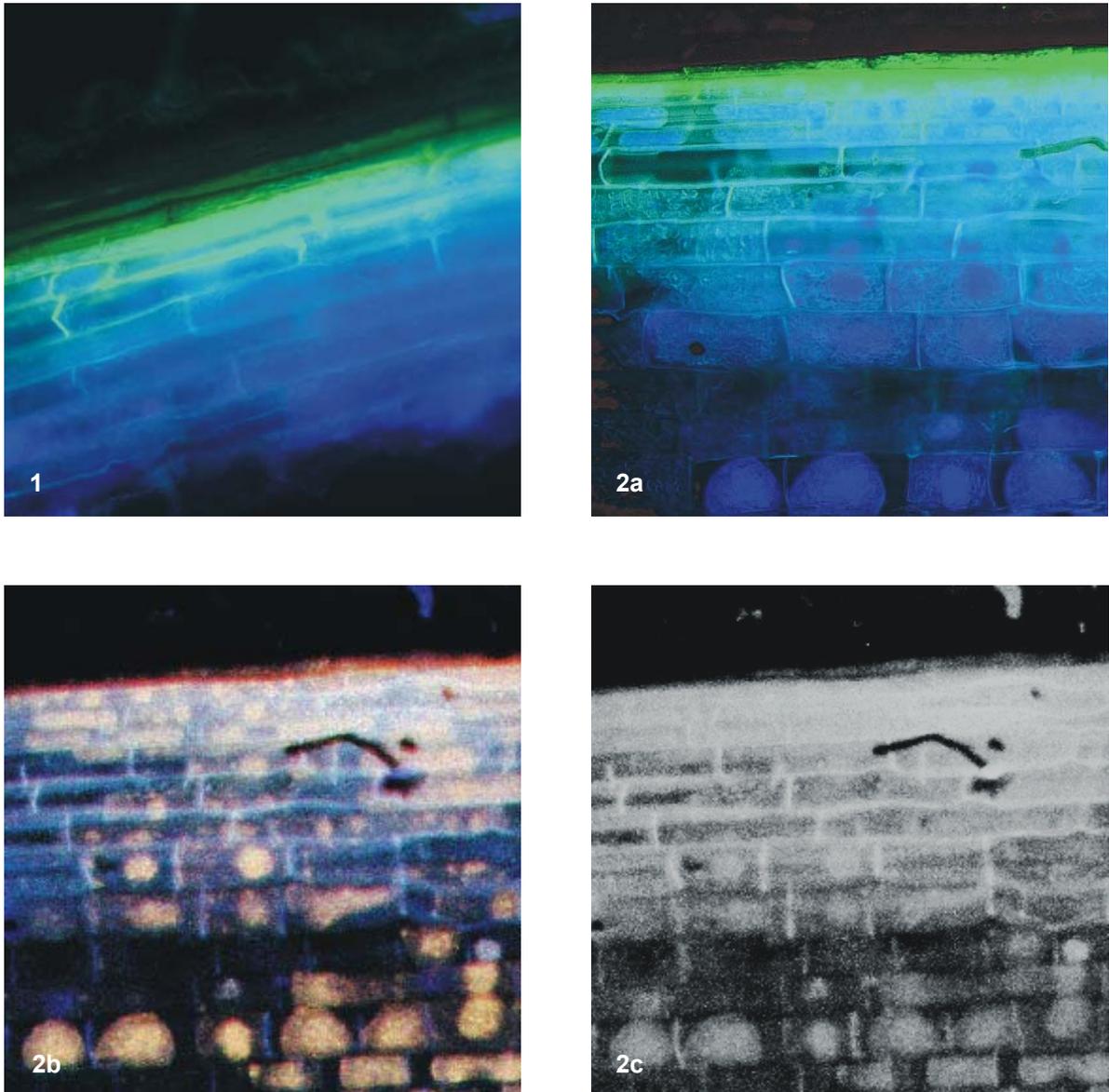


Abbildung 3.3-13: Längsschnitte durch ein Rhizom von *Equisetum arvense* L..
Frischpräparate in 50 % PEG 400 (1) und nach Plasmolyse mit 1 M NaCl (2a, 2b
und 2c).

Aufnahmeparameter:

Aufnahme	Methode	Farbe	Anregung	Emission
1, 2a	konventionelle Fluoreszenzmikroskopie	blau	340-380 nm	435-485 nm
		grün	460 500 nm	510-560 nm
2b	LSM	blau	365 nm	400-435 nm
		grün	365 nm	515-565 nm
		rot	365 nm	>590 nm
2c	LSM		365 nm	400-435 nm

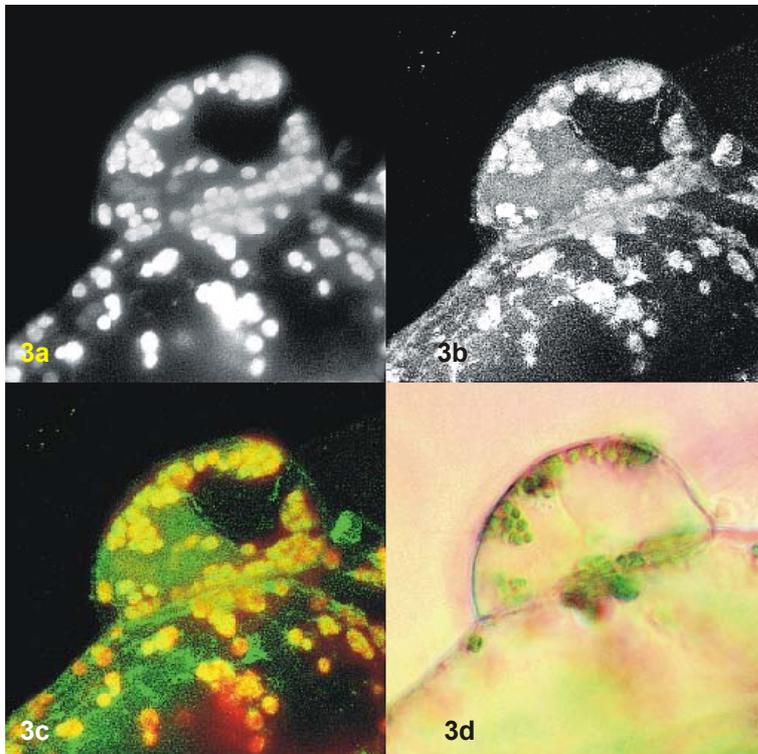
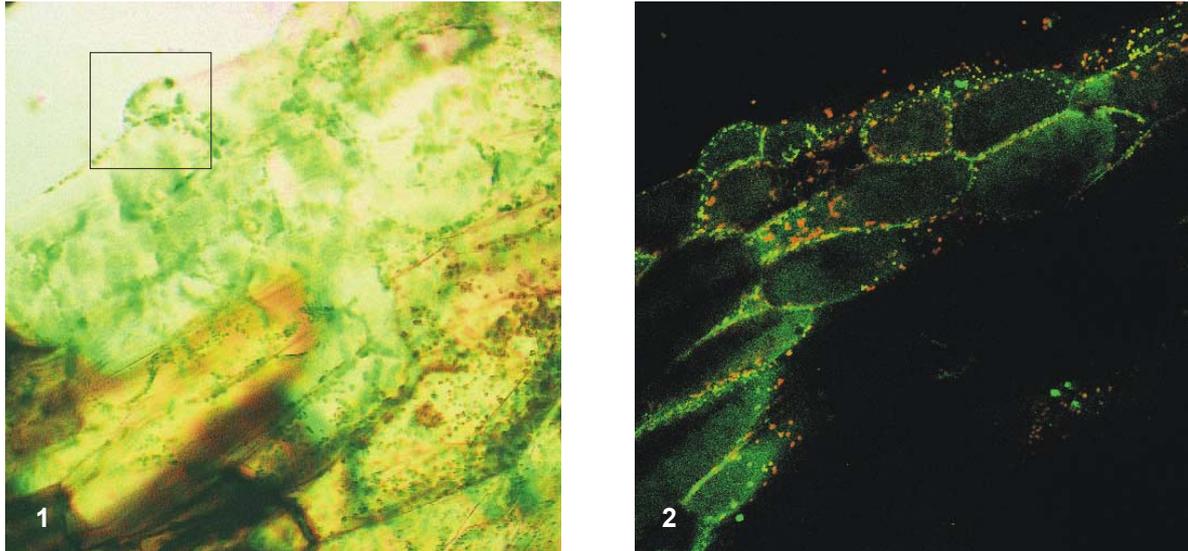


Abbildung 3.3-14: Prothalliengewebe von *Equisetum arvense* L. (Frischpräparat, Wasser) nach Plasmolyse mit 1 M NaCl. In Aufnahme (3) ist eine Einzelzelle vergrößert dargestellt (siehe Kasten in (1)). Aufnahmen (1) und (2) sind wegen Verschiebung des Objektes zwischen den Aufnahmen nicht deckungsgleich. Bilderzeugung mit LSM.

Aufnahmeparameter:

Aufnahme	Anregung	Emission
3a	488 nm	(G) 515-565 nm
3b	488 nm	(R) >590 nm
2, 3c	gemeinsame Darstellung der beiden Emissionsbereiche durch die Farben grün (G) und rot (R).	
1, 3d	LSM-Transmissionsaufnahme	

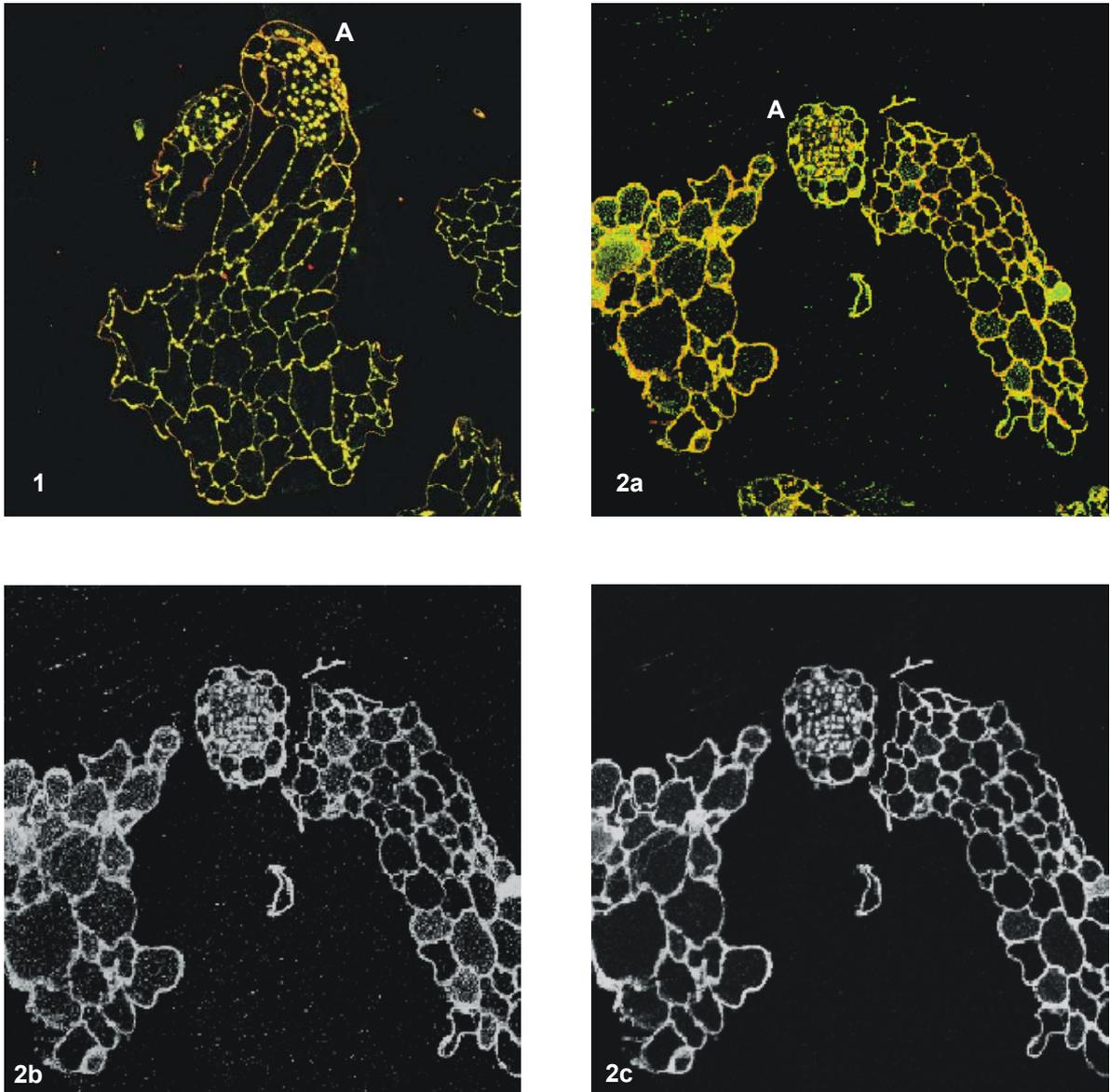


Abbildung 3.3-15: Dünnschnitte (Dauerpräparate, Harzeinbettung) durch Prothallengewebe von *Equisetum arvense* L. (A: Antheridium). Bilderzeugung mit LSM.

Aufnahmeparameter:

Aufnahme	Anregung	Emission
2b	488 nm	(G) 515-565 nm
2c	488 nm	(R) >590 nm
1, 2a	gemeinsame Darstellung der beiden Emissionsbereiche durch die Farben grün (G) und rot (R).	

3.4 Phenolische Inhaltsstoffe der gametophytischen Gewebe

Bei Untersuchungen der sporophytischen Gewebe wurden in oberirdischen Organen (VEIT *et al.* 1995B) und in Rhizomen (siehe Abschnitt 3.2) interspezifische Variationen im Akkumulationsmuster festgestellt. Daraufhin wurden Gametophyten der Arten *Equisetum arvense* L., *E. sylvaticum* L., *E. palustre* L., *E. telmateia* ERH. und *E. fluviatile* L. untersucht. Die Arten unterschieden sich deutlich in der Wachstumsgeschwindigkeit. In der Regel wurde Prothallienmaterial analysiert, das vier bis acht Wochen subkultiviert worden war. Zum Erntezeitpunkt zeigten diese Gametophyten im Gegensatz zu den länger als 60 Tage subkultivierten keine Alterserscheinungen, wie zum Beispiel Verbräunungsstellen an der Oberfläche. Gametophyten von *E. palustre* wurden aufgrund ihres verhältnismäßig langsamen Wachstums länger kultiviert, um ausreichende Mengen an Material für eine vergleichbare Analyse zu erhalten. Eine lange Subkulturdauer (60-100 Tage) beeinflusste bei dieser Art den Gesamtzustand der Pflanzen weniger als bei den anderen untersuchten Arten. Von *E. telmateia* wurde nur eine Probe untersucht. Nach verzögerter Keimung der Sporen zeigten die Gametophyten ein sehr langsames Wachstum, wodurch nur sehr geringe Mengen an Material geerntet werden konnte. Die Gesamtkulturdauer war bei den analysierten Gametophyten mit Ausnahme von *E. telmateia* etwa gleich und betrug 370-420 Tage. Detektierte Substanzen im Vergleich zu Rhizomen sind in Tabelle 3.4-1 aufgeführt. Sämtliche Komponenten mit Gehaltsangaben sind in Tabellen 7.1-5 - 7.1-8 im Anhang aufgelistet.

Zusammenfassende Betrachtung der Inhaltsstoffmuster von Prothallien im Vergleich zu Rhizomen

Equisetumpyron (**25**) konnte in allen untersuchten Gametophytenarten nachgewiesen werden und stellte wie in Rhizomen stets die Hauptkomponente der Pyrone dar (siehe Tabelle 3.2-4 und Tabellen 7.1-2, 7.1-3.1, 7.1-5 - 7.1-8 im Anhang). Bei allen Arten wurden ebenso die Pyrone 1 (**31**), 3'-Dehydroxy-Equisetumpyron (**36**) und Pyron 3 (**37**) detektiert. Die Verbindung *p*-Methoxyequisetumpyron (**39**) konnte nur in *E. arvense* gefunden werden. Pyron 12 (**11**) wurde in keiner Probe der Gametophyten nachgewiesen. Rhizome und Prothallien einer Art zeigten ähnliche Styrylpyronmuster, diese waren jedoch von Art zu Art unterschiedlich. Der Pyrongesamtgehalt der Prothallien zeigte bei allen Arten starke Schwankungen, lag aber meist unter dem der Rhizome (vergleiche Tabelle 3.4-1 und Tabellen 7.1-5 - 7.1-8 im Anhang).

Bei Hydroxyzimtsäurederivaten ergaben sich für die haploide Generation Gemeinsamkeiten. In sämtlichen untersuchten Prothallien wurde Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure (**50**) detektiert. Auch Monokaffeoyl-*meso*-weinsäure (**10**) wurde in allen Proben gefunden. In Rhizomen konnte Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure dagegen nur bei *E. arvense* und *E. palustre* detektiert werden, Monokaffeoyl-*meso*-weinsäure trat ebenfalls nicht bei allen Arten auf. Insgesamt war das Spektrum an detektierten Säuren in Prothallien größer. Trotz dieser Variationen konnten artspezifische Charakteristika festgestellt werden. Das Verhältnis des Gehaltes der Säure C2 (**24**) in Rhizomen und Gametophyten war beispielsweise bei allen Arten gleich. Bei *E. sylvaticum* wurden die Säuren H1 (**1**) und H4 (**5**) in der haploiden wie in der diploiden

Ergebnisse

Generation in gleichen Relationen detektiert. Insgesamt wurden in den untersuchten Proben bei Prothallien durchschnittlich höhere Gehalte an Hydroxyzimtsäurederivaten ermittelt als in Rhizomen (vgl. Tabelle 3.4-2).

Tabelle 3.4-1: Detektierte Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate in Prothallien (Proth.) und Rhizomen (Rhiz.) verschiedener Arten im Subgenus Equisetum. ++ = Hauptkomponente; + = nachgewiesen; - = nicht nachgewiesen; (+) = wurde in allen Proben dieser Art detektiert; EP = Equisetumpyron; HZS = Hydroxyzimtsäurederivat; MKMWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure; DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure (vgl Tabellen 7.1-5 - 7.1-8 im Anhang).

Peak-Nr	Art Organ Komponente	<i>E. arvense</i>		<i>E. fluviatile</i>		<i>E. sylvaticum</i>		<i>E. palustre</i>		<i>E. telmateia</i>	
		Proth	Rhiz	Proth	Rhiz	Proth	Rhiz	Proth	Rhiz	Proth	Rhiz
11	Pyron12	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
25	EP	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
30	Pyron1	+	+	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+	+	(+)
36	3'-Dehydroxy-EP	+	+	(+)	+	+	-	(+)	(+)	+	(+)
37	Pyron3	(+)	+	(+)	+	(+)	-	-	(+)	+	+
39	p-Methoxy-EP	+	++	-	+	-	-	-	(+)	-	-
41	Pyron5	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	(+)	-	+
15	Pyron14	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
22	Pyron16	(+)	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-
30	Pyron21	(+)	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-
47	Pyron38	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
49	Pyron39	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
52	Pyron45	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-
56	Pyron48	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-
58	Pyron52	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-
60	Pyron58	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-
1	HZS H1	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-
2	HZS H2	+	+	(+)	+	-	-	(+)	-	-	-
3	HZS H3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	HZS H4	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
7	HZS H5	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
8	Chlorogensäure	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	HZS H6	-	(+)	-	-	+	-	-	(+)	-	-
10	MKMWS	+	+	+	-	-	-	-	(+)	+	-
16	HZS H8	-	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-
17	HZS H9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
18	HZS H10	(+)	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-
19	HZS H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
23	HZS H12	-	(+)	(+)	-	+	-	-	-	(+)	-
24	HZS C12	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
34	HZS H15	(+)	-	(+)	-	-	(+)	+	-	+	+
35	HZS H16	-	+	-	-	+	(+)	(+)	-	+	+
40	HZS H17	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-
42	HZS H18	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
44	HZS H19	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-
45	HZS H20	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
50	DKMWS	++	+	+	-	++	-	+	(+)	+	-
53	HZS H21	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
54	HZS H22	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
57	HZS H23	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	+	-
59	HZS H24	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-

Ergebnisse

Tabelle 3.4-2: Absolute und relative Gehalte ($\pm s$) von Styrylpyronen und Hydroxyzimtsäurederivaten in Prothallien (Proth) und Rhizomen (Rhiz) verschiedener Arten des Subgenus Equisetum. EP = Equisetumpyron; HZS = Hydroxyzimtsäurederivate; Ges = Gesamtgehalt. Proben von Prothallien mit Subkulturdauer > 60 d gehen in die Berechnung nicht mit ein (Ausnahmen: *E. palustre* und *E. telmateia*) (vgl. Tabellen 7.1-5 - 7.1-8 im Anhang).

Art Organ Komponente	<i>E. arvense</i>		<i>E. fluviatile</i>		<i>E. sylvaticum</i>		<i>E. palustre</i>		<i>E. telmateia</i>	
	Proth	Rhiz	Proth	Rhiz	Proth	Rhiz	Proth	Rhiz	Proth	Rhiz
Gesamtgehalt Pyrone	0,43	0,49	0,15	0,28	0,06	0,01	0,01	0,17	0,07	0,28
	$\pm 0,25$	$\pm 0,08$	$\pm 0,13$	-	$\pm 0,04$	$\pm 0,002$	-	$\pm 0,12$	-	-
Gesamtgehalt HZS	0,08	0,24	0,05	0,02	0,55	0,23	0,07	0,07	0,19	0,49
	$\pm 0,04$	$\pm 0,11$	$\pm 0,03$	-	$\pm 0,16$	$\pm 0,05$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	-	-
Quotienten	81	58	92	68	70	41	24	77	74	87
EP / Ges. Pyrone	± 7	± 8	± 8	-	± 25	± 9	± 6	± 17	-	-
HZS / Ges. Phenole	39	14	35	6	92	96	83	49	75	64
	± 15	± 4	± 13		± 7	± 3	± 4	± 30		

3.5 Enzymaktivitäten

3.5.1 Detektion der entstandenen Reaktionsprodukte bei Styrylpyronsynthase-Aktivität

Gametophyten

Die enzymkatalysierte Umsetzung von Kaffeoil-CoA (**4**) mit zwei Molekülen Malonyl-CoA (**11**) zu Hispidin (**6**) sowie die Umsetzung von *p*-Cumaroyl-CoA (**3**) mit zwei Molekülen Malonyl-CoA zu Bisnoryangonin (**5**) konnte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.5-1: Reaktionen im *in-vitro* Enzymtest sowie eine Einbindung postulierter Nebenreaktionen).

Die Identität der Produkte wurde mittels Referenzsubstanzen durch Coelution und Vergleich der *on-line*-UV-Spektren bei HPLC-Analysen nachgewiesen und durch HPLC-MS/MS Experimente mit der Referenzsubstanz Hispidin sowie durch die Analyse der *in-vitro* Enzymtestlösungen bestätigt (siehe Abbildung 3.5-2 und Abbildung 3.5-3 der HPLC-MS-Ergebnisse sowie Abbildung 3.5-4 - Abbildung 3.5-9: Darstellung der erhaltenen HPLC-Chromatogramme der Tests und deren Kontrollen).

Die Bestimmung der Molekularmassen der Styrylpyrone Hispidin (**6**) und Bisnoryangonin (**5**) erfolgte durch Messungen mit chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) im positiven Modus. Es bildeten sich protonierte Molekülonen $[M+H]^+$. Die thermische Zersetzung zu Fragmentationen im Interface war fast vernachlässigbar. Analysen im negativen APCI-Mode ergaben keine Ergebnisse. In Anwesenheit von TFA, das dem Fließmittel zur besseren Chromatographie beigesetzt wurde, bildeten sich keine deprotonierten Molekülonen. HPLC-APCI-MS/MS Experimente mit Hispidin (**6**) und den Metaboliten der Styrylpyronsynthesereaktion ergaben strukturspezifische Produktionen nach Fragmentierung der protonierten Molekularionen m/z 247 bzw. m/z 231. Das Fragmentierungsmuster des Molekularions m/z 247 entspricht dem Muster nach Erhalt einer „electron impact ionization“ von Hispidin, veröffentlicht von HATFIELD (HATFIELD und BRADY 1971). Charakteristisch für bis-hydroxylierte Arylreste sind ein Verlust von CO und H₂O Ionen mit der Massenzahl m/z 137 und m/z 163. Das Fragmentierungsmuster des Metaboliten im Styrylpyronsynthase-Enzymtest mit *p*-Cumaroyl-CoA zeigt deutlich das Muster eines Styrylpyrones mit einem monohydroxylierten Arylrest mit den charakteristischen Fragmenten: m/z 121 und m/z 147. Zusammenfassend belegen die MS/MS Daten mit den Molekularmassenbestimmungen und die *on-line*-UV-Spektren der HPLC-Analyse die Identität des Hispidins bzw. des Bisnoryangonin als Reaktionsprodukte der Styrylpyronsynthase.

Ergebnisse

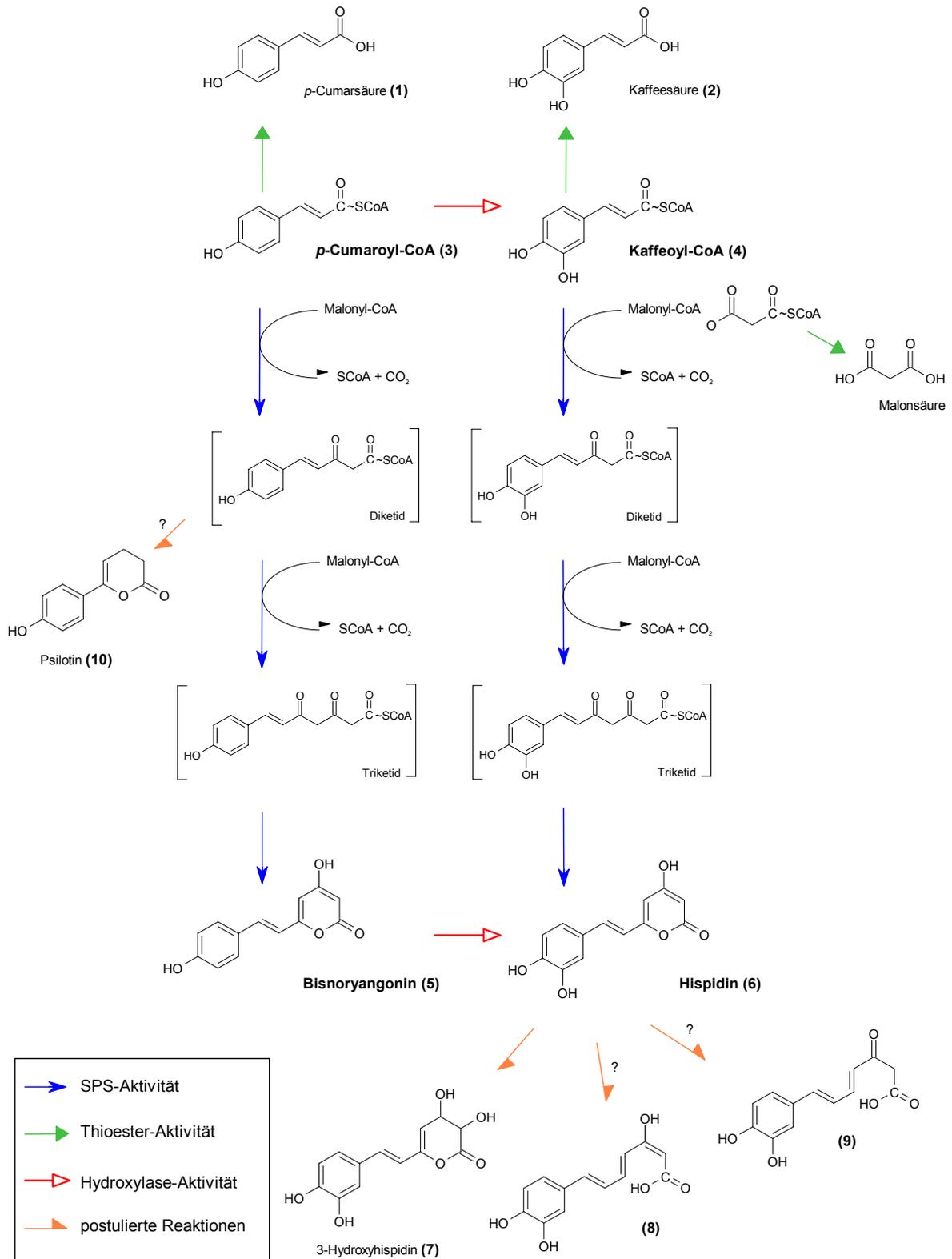


Abbildung 3.5-1: Biosynthesewege im Styrylpyronstoffwechsel.

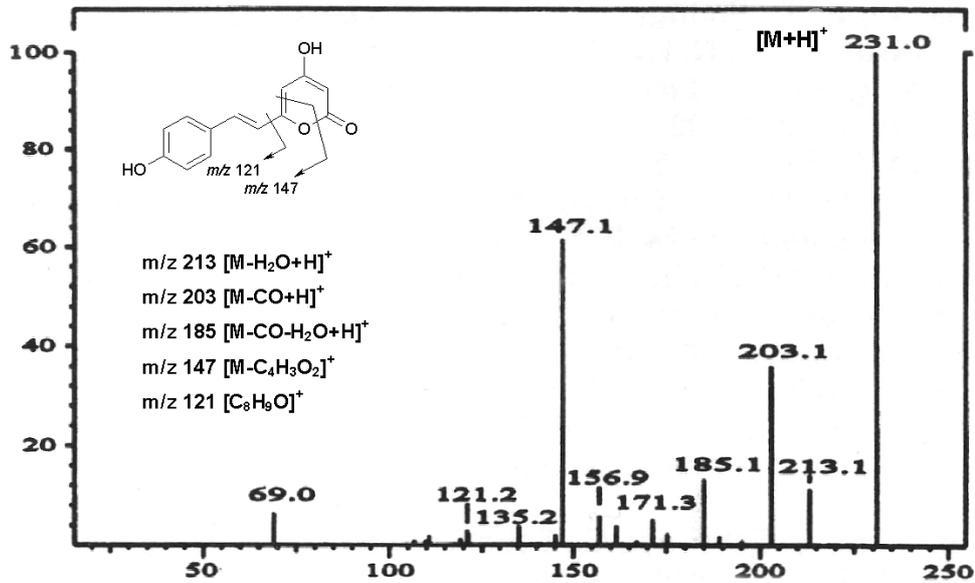


Abbildung 3.5-2: Massenspektrum von Bisnoryangonin

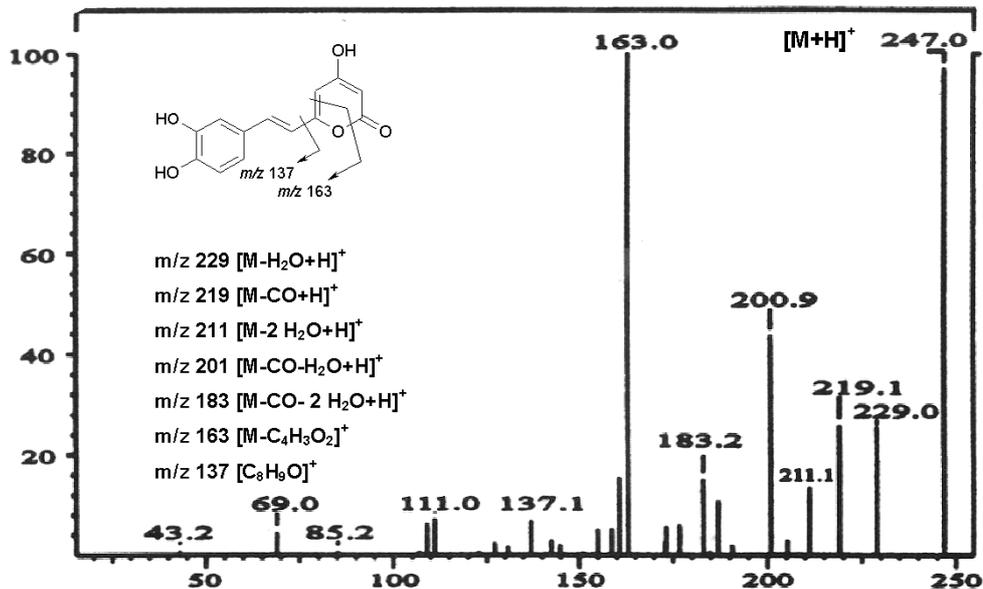


Abbildung 3.5-3: Massenspektrum von Hispidin.

Im *in-vitro* Enzymtests mit *p*-Cumaroyl-CoA als Substrat tauchen die Hydroxylierungsprodukte Hispidin (**6**) und Kaffeoyl-CoA (**4**) als Nebenprodukte auf.

Die weiteren Nebenprodukte (NPK 1, 2 und NPC 1-3) gehen ebenfalls auf eine enzymatische Umsetzung von Kaffeoyl-CoA bzw. *p*-Cumaroyl-CoA als alleinigem Substrat zurück (siehe Abbildung 3.5-5 und Abbildung 3.5-8). Detektiert wurden unter anderem *p*-Cumarsäure (**1**) bzw. Kaffeesäure (**2**) als Hydrolyseprodukte einer Thioesterspaltung. Die

Ergebnisse

enzymatische Spaltung von Malonyl-CoA zu Malonsäure (**12**) konnte mit einer HPLC-Analytik nicht beobachtet werden. Hinweise für diese Reaktion gaben DC-Analysen von Testreihen mit ^{14}C markiertem Malonyl-CoA als Substrat für Proteinrohextrakte (siehe Abbildung 3.5-10 und Abschnitt 2.7.2.3). Zum Vergleich ist ein DC-Chromatogramm ohne Verwendung von radioaktiv markiertem Malonyl-CoA abgebildet (siehe Abbildung 3.5-10).

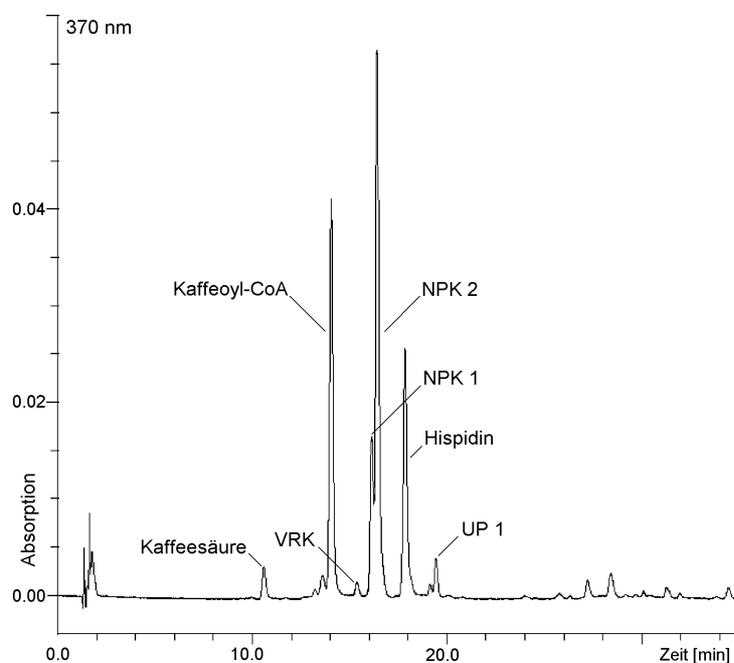


Abbildung 3.5-4: Chromatogramm des *In-vitro*-Enzymtests, Kaffeyl-CoA und Malonyl-CoA inkubiert mit Gametophytenprotein-extrakt. NPK 1,2: Nebenproduktkomponenten, UP 1: Unbekanntes Produkt.

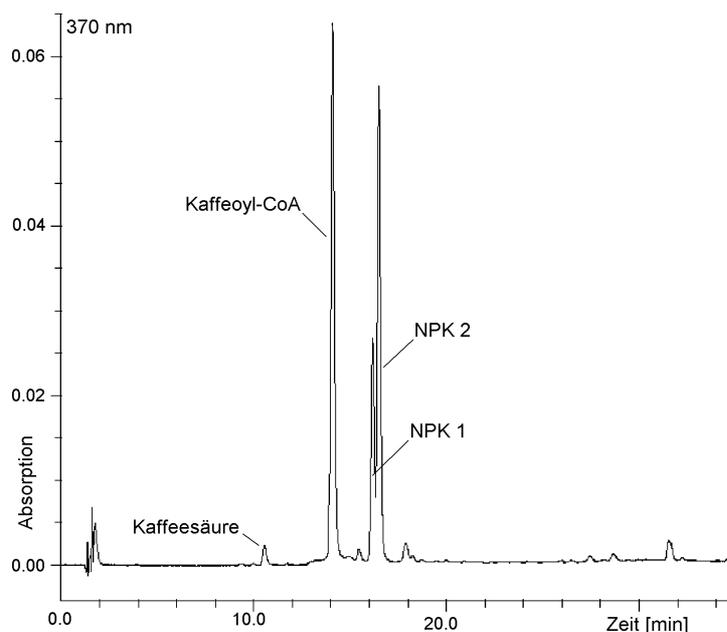


Abbildung 3.5-5: Chromatogramm des Kontrollansatzes: Kaffeyl-CoA inkubiert mit Gametophytenprotein-extrakt. NPK 1,2: Nebenproduktkomponenten

Ergebnisse

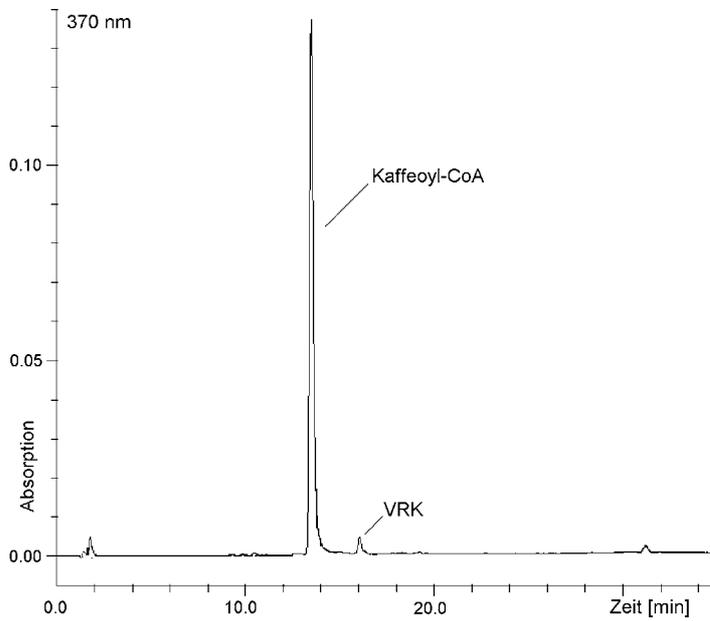


Abbildung 3.5-6: Chromatogramm des Kontrollansatzes: Malonyl-CoA und Kaffeoyl-CoA inkubiert mit hitzedenaturiertem Protein. Malonyl-CoA wird bei 370 nm nicht detektiert. VRK: Verunreinigung der Kaffeoyl-CoA Charge.

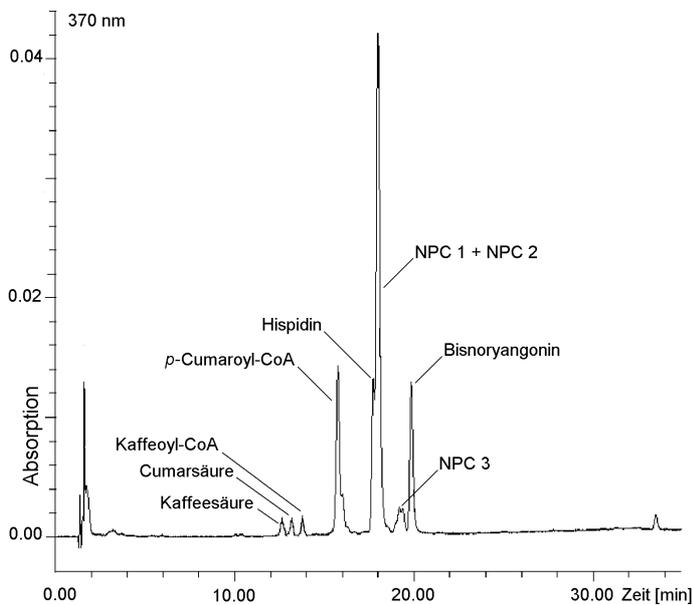


Abbildung 3.5-7: Chromatogramm des *In-vitro*-Enzymtests, *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA inkubiert mit Gametophytenproteinextrakt. NPC 1, 2, 3: Nebenproduktkomponenten.

Ergebnisse

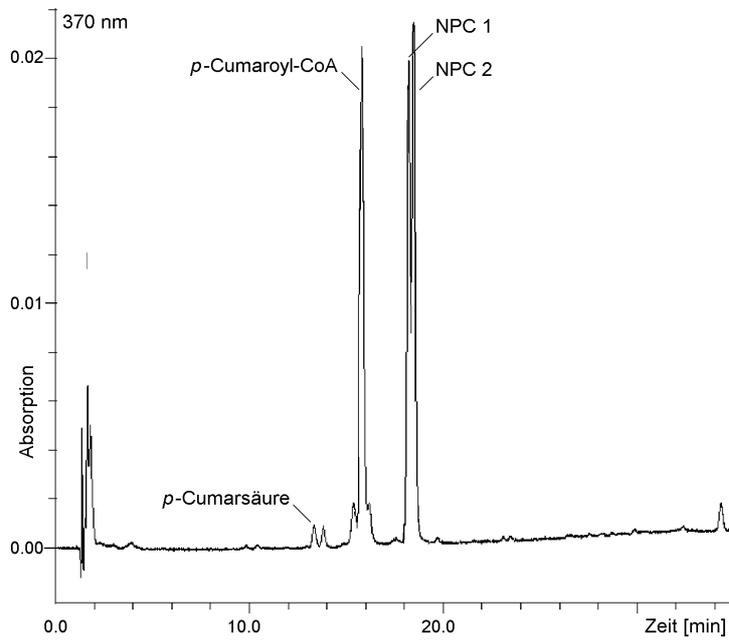


Abbildung 3.5-8: Chromatogramm des Kontrollansatzes: *p*-Cumaroyl-CoA inkubiert mit Gametophytenproteinextrakt. NPC 1,2: Nebenproduktkomponenten

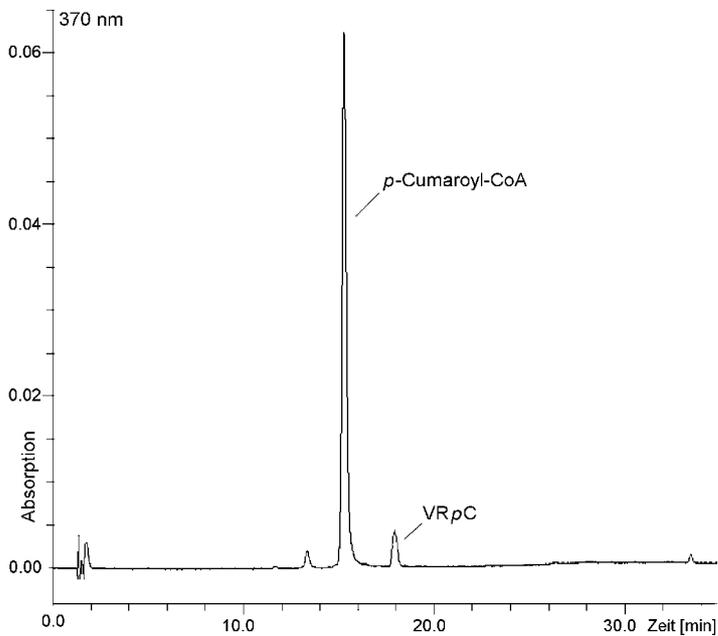


Abbildung 3.5-9: Chromatogramm des Kontrollansatzes: Malonyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA inkubiert mit hitze-denaturiertem Protein. Malonyl-CoA wird bei 370 nm nicht detektiert. VRpC: Verunreinigung der *p*-Cumaroyl-CoA Charge.

Ergebnisse

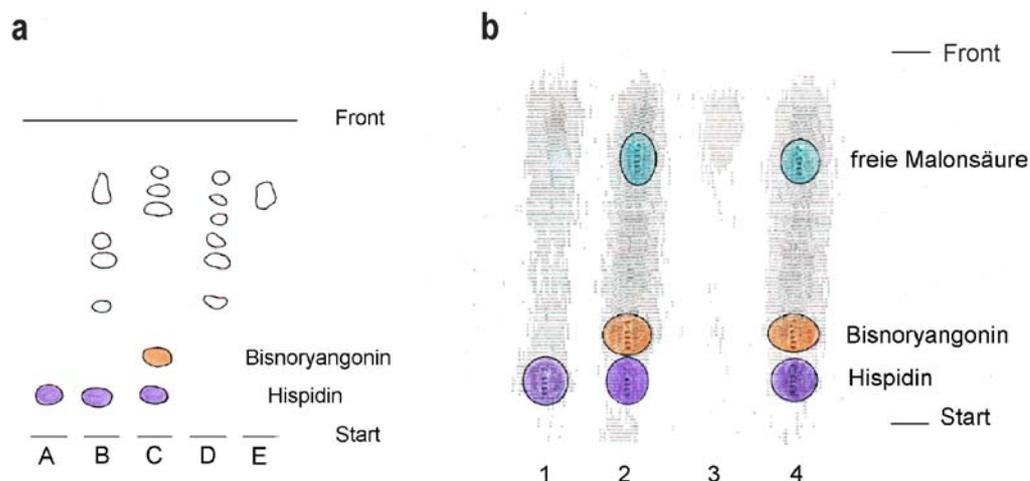


Abbildung 3.5-10: **a)** Dünnschichtchromatographisches Bild der *in-vitro*-Enzymtests, der Kontrollansätze und der Referenzsubstanz Hispidin.

- A:** Hispidin
- B:** *in-vitro*-Enzymtest mit Kaffeoyl-CoA und Malonyl-CoA
- C:** *in-vitro*-Enzymtest mit *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA
- D:** Kontrollansatz mit *p*-Cumaroyl-CoA
- E:** Kontrollansatz mit hitzedenaturiertem Enzym

b) Radioscan der Versuche mit radioaktiv markiertem Malonyl-CoA

- 1:** *in-vitro*-Enzymtest mit Kaffeoyl-CoA und Malonyl-CoA
- 2:** *in-vitro*-Enzymtest mit *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA
- 3:** Kontrollansatz mit hitzedenaturiertem Enzym
- 4:** *in-vitro*-Enzymtest mit *p*-Cumaroyl-CoA

Die Stabilität des Hispidins wurde unter den *in-vitro*-Testbedingungen überprüft. Es wurden Strukturveränderungen des Hispidins in Abhängigkeit vom pH-Wert und Puffersubstanz der Lösung nachgewiesen (siehe Tabelle 3.5-1). Die Puffersubstanz Kaliumphosphat erwies sich hinsichtlich der Stabilität mit einer Wiederfindungsrate von 99 % am geeignetsten .

Tabelle 3.5-1: Detektion von Hispidin in verschiedenen Puffern mit unterschiedlicher pH-Werten. Im Test wurden jeweils 24 ng Hispidin eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (s) der detektierten Hispidinmenge in ng aus drei parallelen Wiederholungsexperimenten ($n = 3 \pm s$). Die Wiederfindungsraten wurden unter den jeweiligen Mengenangaben in Klammern gesetzt.* Detektion eines zusätzlichen Peaks mit einem für Pyrone typischen on-line-UV-Spektrum.

Puffersubstanz:	MES		KPi	Tris/HCl	Glycin	
pH-Wert:	5,5	6,5	6,8	7,5	9,1	10,1
Hispidin [ng]	$8,8 \pm 0,3$	$11,9 \pm 0,2$	$22,1 \pm 0,8$	$15,1 \pm 0,2$	$14,9 \pm 0,4$	$12,6 \pm 0,7$
	(39 %)	(53 %)	(99 %)	(67 %)	(67 %)*	(56 %)*

Ergebnisse

Zur Kontrolle wurde ebenfalls Hispidin als Substrat dem Proteinrohextrakt zugegeben. Hier konnten enzymatische Umbildungen der Substanz nachgewiesen werden, die aber im Standard *in-vitro* Enzymtest (zugesetzte Substrate sind hier Malonyl-CoA, Kaffeoyl-CoA bzw. *p*-Cumaroyl-CoA) nicht detektiert wurden bzw. die durch eingegrenzte Ammoniumsulfat Fraktionierung von 35-70 % auf 40-65 % minimiert wurden. (siehe , Abbildung 3.5-12 und Abbildung 3.5-13).

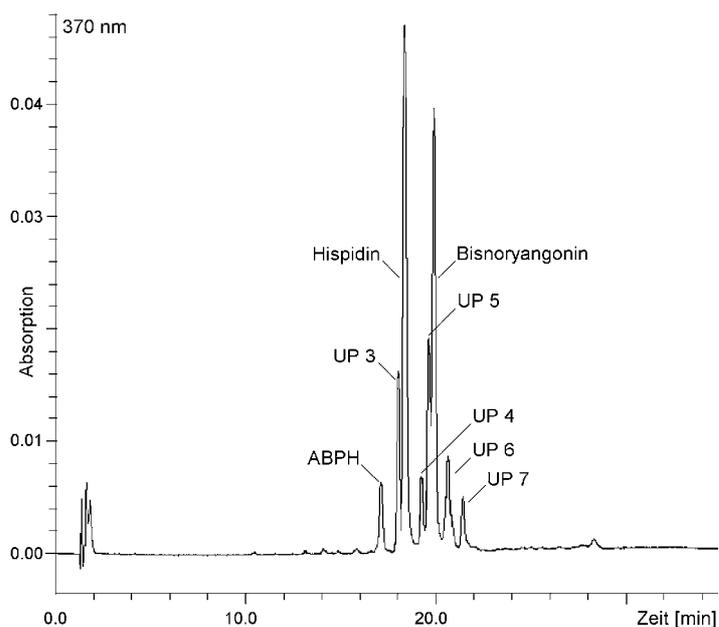


Abbildung 3.5-11:
Chromatogramm des *in-vitro*-Enzymtests mit Gametophytenproteinrohextrakt (35-75 % Ammoniumsulfatfällung). ABPH: Abbauprodukt des Hispidin; UP 3,4,5,6,7: Unbekannte Produktkomponenten mit Pyron *on-line* UV-Spektren.

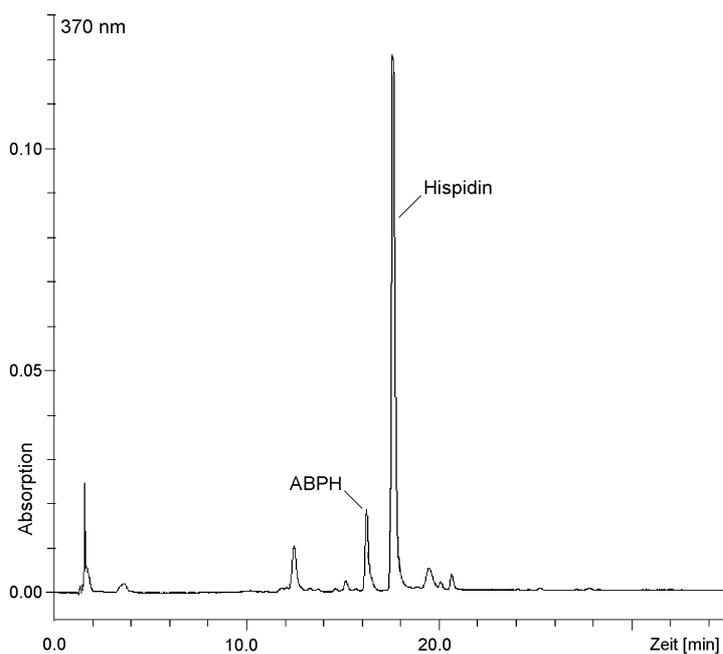


Abbildung 3.5-12:
Chromatogramm des *in-vitro*-Enzymtests mit Proteinrohextrakt (40-65 % Ammoniumsulfatfällung). ABPH: Abbauprodukt des Hispidin.

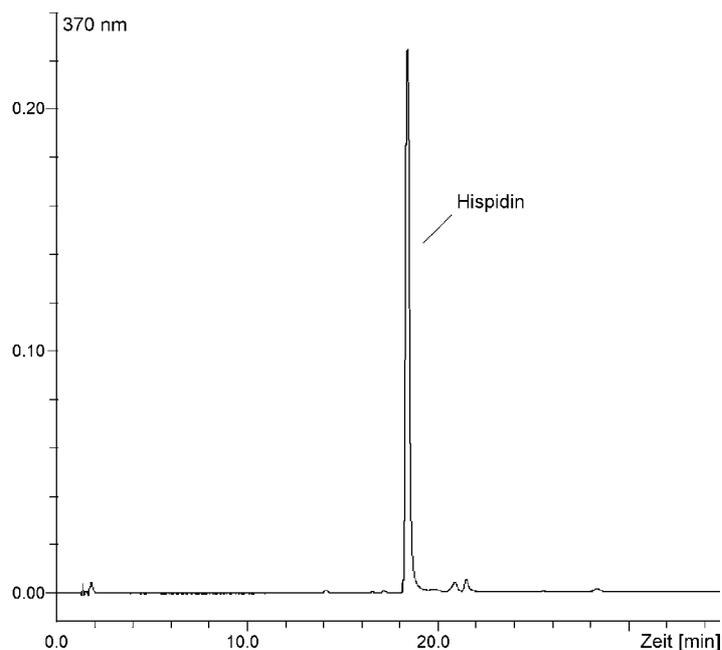


Abbildung 3.5-13:
Chromatogramm des
Kontrollansatzes mit hitze-
denaturiertem Enzym

Sporophyten und Rhizome von *Equisetum arvense* L.

Mit Proteinextrakten aus fertile Sporophyten und Rhizomen konnte ebenfalls eine SPS Aktivität nachgewiesen werden. *In-vitro*-Enzymtests mit Rhizomproteinextrakten führten zur Detektion zweier weiterer Produkte UP7 und UP8, die ein Styrylpyron *on-line* UV-Spektrum aufwiesen.

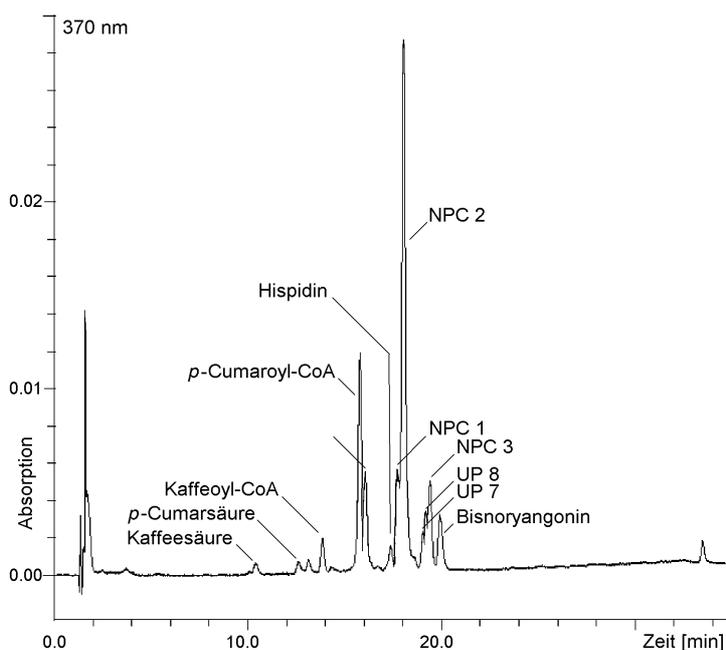


Abbildung 3.5-14:
Chromatogramm des *in-vitro*-
Enzymtest mit
Rhizomproteinextrakten von
Equisetum arvense L mit
p-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA
als zugesetzten Substraten. NPC
1,2, 3:
Nebenproduktkomponenten
UP 7, 8: Unbekannte
Produktkomponenten mit Pyron
on-line UV-Spektren

3.5.2 Optimierung der Enzymextraktion und der *in-vitro*-Enzymtest-Bedingungen für die Styrylpyronsynthase aus Gametophyten von *Equisetum arvense* L.

Homogenisierung des Pflanzenmaterials

Die Hauptprobleme bei der Herstellung von Proteinextrakten aus Pflanzenmaterial, die Enzyme in ihrer aktiven Form enthalten sollen, ergaben sich aus hohen Gehalten an Polyphenolen und die sehr feste Beschaffenheit der Zellwände (GEGENHEIMER 1990, LOOMIS 1974). Phenole können kovalente und nicht kovalente Bindungen zu Proteinen ausbilden und damit die Enzymaktivität beeinträchtigen (SPENCER 1988) (JERVIS 1989). Bei der Homogenisierung des Pflanzenmaterials werden zudem Enzymsysteme freigesetzt wie z. B. Polyphenoloxidasen, Monophenoloxidasen und eventuell Peroxidasen, die die Bildung von Chinonen und Semichinonen katalysieren. Dies führt wiederum zur Polymerbildung von Phenolen und Bindung dieser Aggregate an Proteine. Chinone, die beim Aufbrechen von Zellen ebenfalls freigesetzt werden können oder durch Katalyse von entsprechend freigesetzten Enzymen entstehen, bewirken eine Oxidation der freien Sulfhydrylgruppen von Proteinen. Bei Oxidation bilden diese Sulfhydrylgruppen intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken, woraus meist ein Verlust der Enzymaktivität resultiert, falls diese freien Sulfhydrylgruppen eventuell Funktionen bei der Substratbindung ausüben (COOPER 1980).

Für die Extraktion der Styrylpyronsynthase aus Gametophyten von *Equisetum arvense* L. wurden verschiedene Protokolle zur Extraktion unterschiedlicher Polyketidsynthasen aus verschiedenen Pflanzenmaterialien sowie von Hydroxycimtsäuretransferasen aus Gametophyten von *Equisetum arvense* L. herangezogen (siehe Abschnitt 2.7.2.2) und mussten hinsichtlich der SPS-Aktivität optimiert werden, da die Aktivität der Styrylpyronsynthase an der Nachweisgrenze lag. In Anlehnung an eine beschriebene Extraktion von (ZUURBIER *et al.* 1993) konnte eine SPS-Aktivität nachgewiesen werden. Das Pflanzenmaterial ließ sich in flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver zermörsern und wurde in gefrorenem Zustand im Extraktionspuffer (siehe Abschnitt 2.7.1.1 Puffer PE1) suspendiert. So konnte das Material ausreichend homogenisiert und die Reaktionen der freigesetzten Substanzen minimiert werden. Der Rohextrakt wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (30–70 %) unterzogen, anschließend über PD10 wiederholt entsalzt und dabei auch von weiteren Phenolen abgetrennt. Im weiteren wurde der Extrakt durch einen Ultrazentrifugationsschritt mit Hilfe einer anisotropen Membran (Centricon-30) konzentriert (siehe Abschnitt 2.7.1). Die Abtrennung von Membranbestandteilen über einen Zentrifugationsschritt mit 100000 x g brachte eine zusätzliche Reinigung des Proteins.

Tabelle 3.5-2 gibt die Ergebnisse der einzelnen Extraktionsschritte wieder. Angegeben sind zum einen die Ergebnisse des Tests mit anschließender HPLC-Detektion. Um mit Hilfe der HPLC eine SPS-Aktivität nachweisen zu können, musste nach jedem Reinigungsschritt der Proteinextrakt vor Zugabe zum *in-vitro*-Enzymtest mit Hilfe von Centricon-30 konzentriert werden. Zum anderen sind die Ergebnisse des *in-vitro*-Enzymtests mit radioaktiv markiertem Malonyl-CoA aufgeführt. Dieser Test wurde nicht mit den ermittelten optimalen Substratkonzentrationen durchgeführt, da für den Nachweis der Enzymaktivität geringere

Ergebnisse

Substratkonzentrationen ausreichen. Dies erklärt die aufgeführten unterschiedlichen Aktivitäten. Da die Detektion bei diesem Test aber wesentlich sensitiver war als bei der HPLC-Detektion, konnten Enzymaktivitäten nachgewiesen werden, ohne dass der zugesetzte Proteinextrakt vor der Zugabe zum *in-vitro*-Enzymtest konzentriert werden musste.

Tabelle 3.5-2: Ergebnisse der einzelnen Schritte bei der Extraktion der Styrylpyronsynthase. Zum Nachweis mittels HPLC-Detektion war die Konzentrierung über Centricon-30 für jeden Schritt notwendig. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der SPS-Aktivitätsbestimmung aus drei unabhängigen Wiederholungsexperimenten ($n = 3 \pm s$). Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoly-CoA-Ester im Test: *p*-Cumaroyl-CoA, /: Enzymaktivität nicht nachweisbar, -: Schritt nicht durchgeführt.

Schritt	SPS-Aktivität [pkat·mg ⁻¹ Protein]	
	HPLC-Detektion	Detektion radioaktiv markierter Produkte
1 Rohextrakt	0,6 \pm 0,1	0,38 \pm 0,01
2 Ammoniumsulfatfällung	/	0,19 \pm 0,02
3 1. Entsalzung über PD 10	4,6 \pm 0,3	0,56 \pm 0,01
4 2. Entsalzung über PD 10	6,0 \pm 1,0	-
5 100000 x <i>g</i> Zentrifugation	10,5 \pm 0,2	0,80 \pm 0,07
6 Konzentrierung über Centricon-30		1,36 \pm 0,04

Keine Erfolge wurden beim Nachweis einer SPS-Aktivität bei Extraktion in anderen Puffersystemen erzielt wie z. B. bei der Verwendung eines Tris/HCl-Puffersystems, das für die Extraktion von Kaffeoyltransferasen aus *E. arvense* Gametophyten (HOHLFELD 1998) oder bei der Extraktion der Chalconsynthase aus *Petroselinum hortense* HOFFM. Zellsuspensionskulturen (KREUZALER *et al.* 1979) herangezogen wurde.

Abhängigkeit von Polyvinylpyrrolidon (PVP, Polyklar AT)

Nach (LOOMIS 1974) kann die Zugabe von Polyklar AT die nicht-denaturierende Extraktion von löslichen Proteinen erheblich verbessern. Auch wenn Polyklar AT als relativ inert gegenüber Proteinen gilt, konnten dennoch Wasserstoffbrückenbindungskomplexe mit Proteinen nachgewiesen werden (LOOMIS 1974). Deswegen sollte für eine erschöpfende Extraktion ein Schritt der wiederholten Extraktion der abzentrifugierten Zellreste mit Polyklar AT gehören. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen bestätigen dies eindeutig. Die Proteinausbeute betrug zum Teil 50 % der Proteinmenge, die bei der ersten Extraktion erhaltenen wurde. In Tabelle 3.5-3 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe exemplarisch dargestellt. Bei unabhängigen Wiederholungen konnten die Ergebnisse bestätigt werden.

Ergebnisse

Der optimale Anteil an Polyklar AT im Extraktionspuffer muss speziell für jedes Pflanzenmaterial getestet werden. Bei der Extraktion der Styrylpyrongsynthase erwies sich die Zugabe von 50 % Polyklar AT bezogen auf das Frischgewicht an Pflanzenmaterial als optimal (siehe Tabelle 3.5-4 und Abbildung 3.5-15). Bei diesen Testreihen wurden die Konzentrationen von Natriumascorbat (20 mM) und Mercaptoethanol (7 mM) aus den Angaben von (ZUURBIER *et al.* 1993) beibehalten, um einen sicheren SPS-Nachweis zu gewährleisten.

Tabelle 3.5-3: Ergebnisse der wiederholten Extraktion des Rohextraktes mit Polyklar AT (50% w/V). Die SPS-Aktivität wurde aus der Detektion radioaktiv markierter Produkte ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von durchgeführten Doppelwertbestimmungen. Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-CoA Ester: *p*-Cumaroyl-CoA.

Schritt	Volumen	Protein		SPS-Aktivität
	[mL]	[mg·mL ⁻¹]	[mg]	[pkat·mg ⁻¹ Protein]
Extraktion mit Polyklar AT	80	0,28	22,7	0,023 ± 0,001
Nachextraktion mit Polyklar AT	45	0,25	11,6	0,021 ± 0,001

Tabelle 3.5-4: Einfluss von Polyklar AT auf die Aktivität der SPS. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Wiederholungsexperimenten (n= 3; ± s). Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-CoA Ester: *p*-Cumaroyl-CoA.

Polyklar AT [w/w]	SPS-Aktivität [pkat·mg ⁻¹]	
	Versuchsreihe 1	Versuchsreihe 2
5 [%]	2,6 ± 0,7	1,4 ± 0,2
10 [%]	4,2 ± 0,2	1,5 ± 0,5
30 [%]	3,6 ± 0,1	1,7 ± 1,1
50 [%]	<u>7,2 ± 1,8</u>	<u>4,9 ± 0,2</u>
60 [%]	4,3 ± 0,5	1,0 ± 0,2

Abhängigkeit von Chinonfallen

3.5.2.1.1.1.1 Natriumascorbat

Natriumascorbat kann prinzipiell Chinone zu wiederoxidierbaren Phenolen reduzieren, sowie als Oxidase-Inhibitor agieren (JERVIS 1989, PIERPOINT 1996).

Durch die Zugabe von Natriumascorbat zum Extraktionspuffer kann die SPS verlässlich nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Konzentration von 20 mM auf 40 mM brachte in Einzelwerten eine bis zu 190 %-ige Steigerung der Aktivität (siehe Tabelle 3.5-5 und Abbildung 3.5-15).

3.5.2.1.1.1.2 Sulfhydrylgruppen Schutzreagenzien

Die Oxidation von freien Sulfhydrylgruppen kann durch Zugabe von Mercaptoethanol oder DTT wirksam verhindert werden. Jedoch wurde die Hemmung von Enzymsystemen in Pflanzen durch diese Substanzen von (JERVIS 1989) beschrieben, deswegen ist es sinnvoll verschiedene Konzentrationszugaben zu testen, denn die Aktivität der Styrylpyronsynthase ist möglicherweise abhängig von einem wirksamen Sulfhydrylschutz. Dies wird in Abbildung 3.5-15 und Tabelle 3.5-5 verdeutlicht.

Die höchsten enzymatischen Aktivitäten waren bei einer Konzentration von 14 mM Mercaptoethanol oder 5 mM DTT detektierbar. Eine höhere Konzentration an Mercaptoethanol (21 mM) führte zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität.

Tabelle 3.5-5: Auswirkung von unterschiedlicher Chinonfallen im Extraktionspuffer auf die Aktivität der SPS. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (s).
Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoly-CoA-Ester: *p*-Cumaroyl-CoA.

Chinonfallen	[mM]	SPS-Aktivität [pkat·mg ⁻¹ Protein]	
Natriumascorbat	0	/	
	20	2,9 \pm 0,5	(n = 4; \pm s)
	40	8,6 \pm 1,2	(n = 4; \pm s)
Sulfhydrylgruppen-Schutzreagenz			
Mercaptoethanol	7	9,8 \pm 0,7	(n = 6; \pm s)
	14	19,9 \pm 0,9	(n = 6; \pm s)
	21	7,9 \pm 0,6	(n = 3; \pm s)
DTT	2,5	2,5 \pm 0,5	(n = 3; \pm s)
	5	17,5 \pm 1,3	(n = 5; \pm s)

Ergebnisse

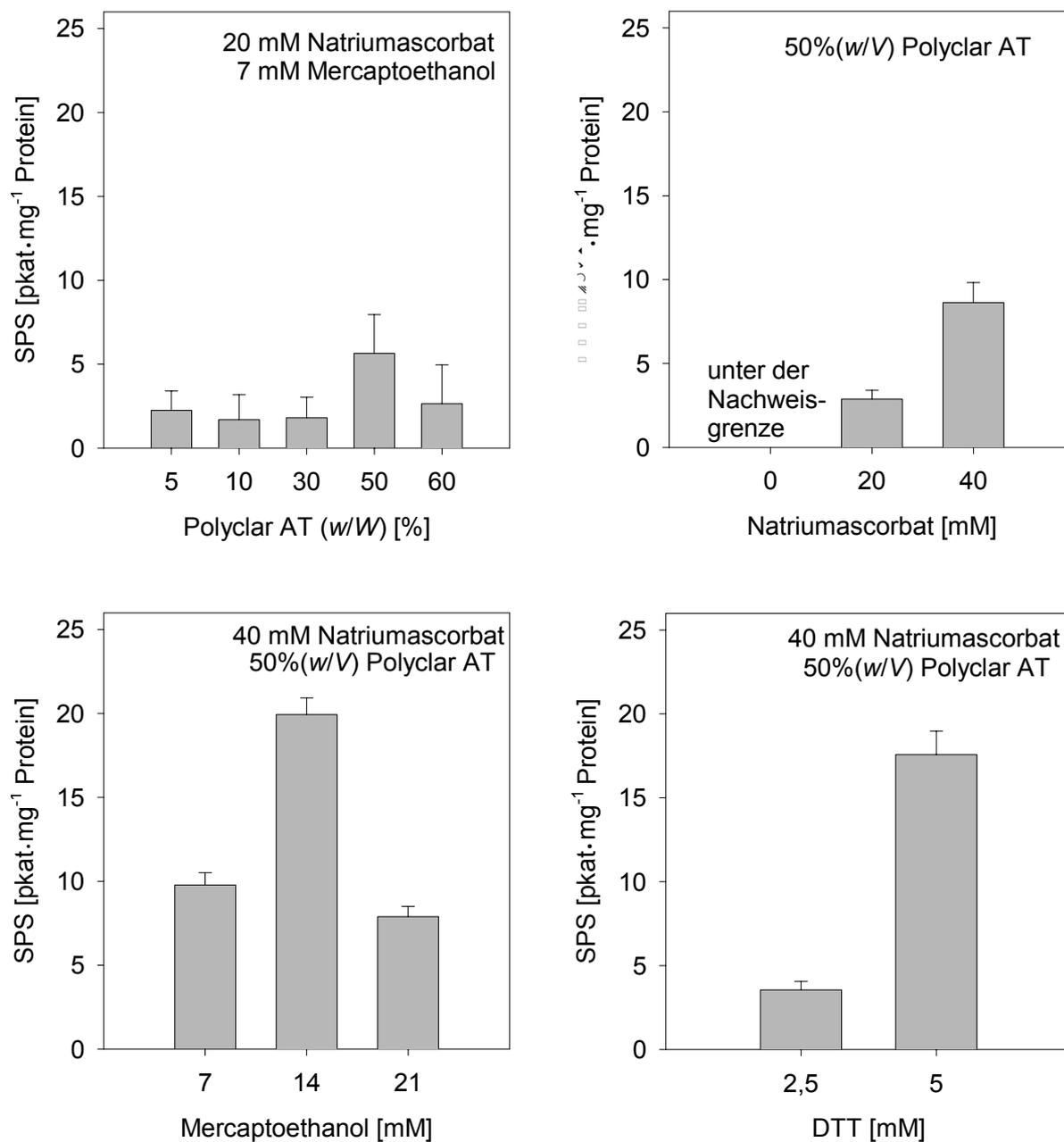


Abbildung 3.5-15: Einfluss von Polyklar AT, Natriumascorbat und den SH-Schutzreagentien Mercaptoethanol und DTT auf die Aktivität der Styrylpyronsynthase. In die jeweiligen Abbildungen gingen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (s) aus parallelen Wiederholungsexperimenten ein. Die Anzahl der Experimente kann aus Tabelle 3.5-5 entnommen werden.

Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (Durchführung siehe 2.7.2.2) ergab, dass die SPS für die Bildung von Bisnoryangonin in einem Bereich von 30-70 % Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfällt. Der Nachweis der SPS-Aktivität über die Bildung von Hispidin war im Gegensatz dazu nur im Bereich von 40-60 % Sättigung möglich (siehe Abbildung 3.5-16).

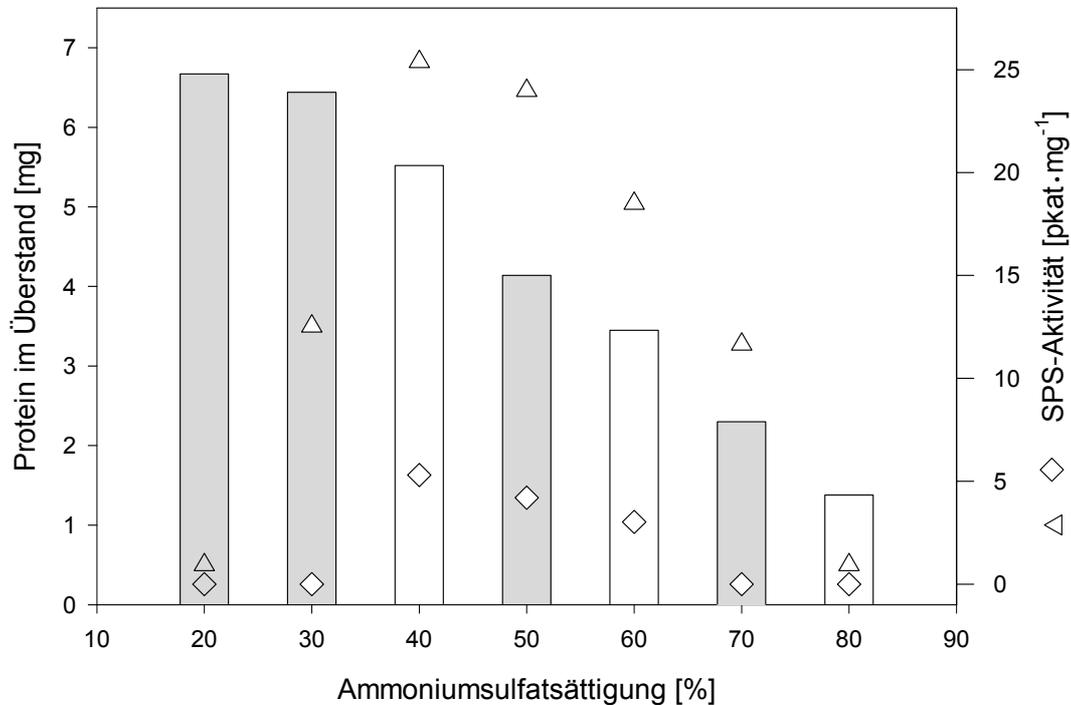


Abbildung 3.5-16 : Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung. Bildung von Hispidin ◆ und Bisnoryangonin ▲ im Vergleich. Jeder Messwert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung.

Die Wahl der geeigneten Ammoniumsulfatkonzentrationen ist immer ein Kompromiss zwischen Ausbeute und Grad der Reinigung. Zur Kontrolle, ob bei dem gewählten Bereich nicht in dem ersten Niederschlag oder im Überstand der höheren Sättigung eine SPS-Aktivität zu detektieren war, wurden eingrenzende Bereiche getestet (siehe Tabelle 3.5-6). Bei der Detektion der Reaktionsprodukte des *in-vitro*-Enzymtests zeigte sich eine Hydroxylierungsaktivität, die *p*-Cumaroyl-CoA zu Kaffeoyl-CoA und Hispidin zu Bisnoryangonin umsetzt. Über die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung wurde festgestellt, dass das Hydroxylierungsprotein nicht im Bereich von 0-40 % Sättigung gefällt wird, während ein SPS-Aktivitätsnachweis der Bisnoryangoninbildung möglich war. Eine Trennung beider Aktivitäten scheint somit möglich.

Ergebnisse

Tabelle 3.5-6: Auswirkung unterschiedlicher Sättigungsbereiche an (NH₄)₂SO₄ auf die SPS-Aktivität. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Wiederholungsexperimenten (n = 3; ± s). / : Enzymaktivität nicht nachweisbar * : detektierte Hydroxylierungsaktivität. HZS: Hydroxyzimtsäure.

Ammoniumsulfat Sättigungsbereich	SPS-Aktivität [pkat·mg ⁻¹]	
	Kaffeoyl-CoA als HZS- CoA-Starter Molekül für die Bildung von Hispidin	p-Cumaroyl-CoA als HZS- CoA-Starter Molekül für die Bildung von Bisnoryangonin
35-70 %	6,9 ± 0,1	12,5 ± 1,1 *
40-65 %	17,6 ± 1,0	10,0 ± 1,1 *
40-60 %	8,5 ± 1,7	8,0 ± 0,7 *
0-35 %	/	6,5 ± 0,8
0-40 %	/	7,4 ± 1,2

Reaktionsabbruch des *in-vitro*-Enzymtests

Die von ZUURBIER (ZUURBIER *et al.* 1993) benutzte Methode den *in-vitro*-Enzymtest abubrechen, indem die Reaktionsprodukte in eine Ethylacetatphase überführt werden, anschließend zur Trockene gebracht und dann für die HPLC-Analyse in Methanol aufgenommen werden, konnte für die Detektion der Styrylpyrone nicht verlässlich angewendet werden. Diese Methode (Versuchsreihe A) lieferte eine Wiederfindung von nur 2 %. Zusätzlich wurden Hispidinzersetzungsprodukte detektiert, nachdem die zur Trockene gebrachten Ansätze bei 10 °C über Nacht gelagert wurden. Eine Gefriertrocknung des Ansatzes (Versuchsreihe C) nach erfolgtem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff führte zu einer Wiederfindung von unter 50 %. Diese Proben ließen sich nur mit Schwierigkeiten in Methanol wieder aufnehmen. Bei der Proteinfällung durch Zugabe von Ethanol zu einer Endkonzentration von 50 % (V/V) (Versuchsreihe B) lag die Wiederfindung bei nahezu 100 %. Eine Säurefällung mit Trichloressigsäure oder auch Trifluoressigsäure führte ebenso zu Hispidinzersetzungsprodukten. Die Ergebnisse von den Versuchen zur Variierung des Reaktionsabbruchs zeigt Tabelle 3.5-7.

Ergebnisse

Tabelle 3.5-7: Wiederfindung der eingesetzten Hispidinmenge bei verschiedenen Aufarbeitungsarten der *in-vitro* Enzymtestansätze. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus 7 Ansätzen ($n=7$; $\pm s$)
A: Überführung der Reaktionsprodukte in eine Ethylacetatphase, die zur Trockenen gebracht wird und vor der HPLC-Analyse in Methanol (25 μ L) aufgenommen wird.

B: Zugabe von Ethanol.

C: Gefriertrocknung des Ansatzes und Aufnahme in Methanol (25 μ L) vor der HPLC-Analyse.

Versuchsreihe	Wiederfindung von Hispidin
A	2 % \pm 0,9
B	98 % \pm 3,0
C	13 % \pm 3,1

3.6 Charakterisierung der Styrylpyronsynthase

3.6.1 Stabilisierung der Proteinlösung

Die Stabilität der SPS während der Lagerung bei Raumtemperatur, 4 °C, -20 °C und -80 °C wurde mit ammoniumsulfatgefällten Rohextrakten (Herstellung siehe 2.7.1) aus Gametophyten von *Equisetum arvense* L. bestimmt. Der Extrakt wurde über PD 10 entsalzt und anschließend mittels Ultrazentrifugation (Centricon-30) auf eine Proteinkonzentration von 1,5-2 mg·mL⁻¹ eingengt. Verschiedene Zusätze, auch in Kombination, sind auf ihren stabilisierenden Einfluss bei der Lagerung getestet worden (Durchführung siehe Abschnitt 2.8.1). Zugesetzt wurden Glycerin, Natriumascorbat und Mercaptoethanol. Untersucht wurde der Einfluss der Variation von Proteinkonzentration und pH-Wert sowie wiederholtes Auftauen der Extrakte. Tabelle 3.6-1 bis Tabelle 3.6-6 zeigen die Auswirkungen der getesteten Möglichkeiten.

Der Zusatz von 10 % (V/V) Glycerin zu der Proteinlösung ermöglichte eine Lagerung über mehrere Monate hinweg bei -80 °C, ohne dass Aktivitätsverluste gemessen werden konnten. Ohne Zusatz von Glycerin wurde bei Lagerung bei -80 °C bereits nach einem Monat nur 90 % der Anfangsaktivität gemessen. Eine Lagerung der Proteinlösung bei -20 °C dagegen senkte die Aktivität des Enzyms bereits nach 24 Stunden mit Glycerinzusatz auf 51 % und ohne Zugabe auf 36 % der Initialaktivität (siehe Tabelle 3.6-1 und Tabelle 3.6-2).

Ergebnisse

Tabelle 3.6-1: Stabilität der SPS nach 1, 2 und 4 Monaten nach Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Glycerinzusatz 10 % und ohne Glycerinzusatz. Aufgeführt sind die Mittelwerte der SPS-Aktivität aus zwei parallelen Wiederholungsexperimenten.

Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-CoA Ester: Kaffeoyl-CoA, * *p*-Cumaroyl-CoA.

SPS-Aktivität [$\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein] und [% der Initialaktivität]								
Glycerinzusatz	t = 0		t = 1 Monat		t = 2 Monate		t = 4 Monate	
10% (V/V)	1,89 ± 0,2	100	1,93 ± 0,1	102	0,95 ± 0,01	106	1,82 ± 0,1	102
	0,89 ± 0,1	100						
	1,78 ± 0,1	100						
*	10,3 ± 0,1	100	11,7 ± 0,2	115	3,4 ± 0,05*	106	2,60 ± 0,1	102
*	3,2 ± 0,03	100						
*	2,53 ± 0,1	100						
ohne Glycerin	13,5 ± 0,3	100	12,16 ± 4	90				

Tabelle 3.6-2: Stabilität der SPS nach 24-stündiger Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit und ohne Glycerinzusatz. Aufgeführt sind die Mittelwerte der SPS-Aktivität aus zwei parallelen Wiederholungsexperimenten. Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-CoA Ester: *p*-Cumaroyl-CoA.

SPS-Aktivität [$\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein] und [% der Initialaktivität]				
Glycerinzusatz	t = 0		t = 1 Monat	
10% (V/V)	9,74 ± 0,1	100	4,99 ± 0,1	51
ohne Glycerin	13,84 ± 1,0	100	7,24 ± 0,5	36

Weitere Zusätze, die zu einer Stabilisierung der SPS über einen längeren Zeitraum führen könnten, wurden in verschiedenen Versuchsreihen bei Raumtemperatur untersucht (siehe Abschnitt 2.8.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6-3 und Tabelle 3.6-4 zusammengefasst. Wird der Extrakt 4 Stunden bei Raumtemperatur ohne Anwesenheit von Glycerin gelagert, sinkt die Aktivität der SPS nach 4 Stunden bereits auf 25 % und ist nach 8 Stunden überhaupt nicht mehr nachweisbar. Natriumascorbat, ein wichtiger Zusatz, ohne den meist keine messbare Aktivität mehr erreicht wurde, kann durch eine Erhöhung der Konzentration in der Proteinlösung nicht zu einer verbesserten Stabilität beitragen. Eine Konzentration von 20 und 40 mM Natriumascorbat bewirkte eine messbare Aktivität von noch 90–100 % der Initialaktivität, ohne Natriumascorbat 25 % nach 4 Stunden, während bei Natriumascorbat-Anwesenheit nach 8 Stunden noch 60–80 % der Anfangsaktivität messbar war. Eine Zugabe von Mercaptoethanol in höheren Konzentrationen bewirkte eher eine Destabilisierung des Proteins. Die Stabilität des Enzyms durch zusätzlich erhöhte NaCl-Konzentrationen in der Lösung wurde im Hinblick auf die Proteinreinigung über Ionenaustauschchromatographie

Ergebnisse

getestet. Nach 4 Stunden konnten nur noch 50-60 % der ursprünglichen Aktivität gemessen werden.

Tabelle 3.6-3: Stabilitätsverhalten der SPS bei Raumtemperatur mit Glycerin -, Natriumascorbat- und Mercaptoethanolzugabe. Aufgeführt sind die Mittelwerte der SPS-Aktivität aus zwei parallelen Wiederholungsexperimenten.

Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-CoA Ester: Kaffeoyl-CoA, * : *p*-Cumaroyl-CoA
#: mit 20 mM Natriumascorbat.

SPS-Aktivität [pkat·mg ⁻¹ Protein] und [% der Initialaktivität]									
Glycerinzusatz	t=0		t = 4 Stunden		t = 8 Stunden		t = 24 Stunden		
10% (V/V)	4,10 ± 0,16	100	2,27 ± 0,03	95	/	0			
20 % (V/V)	4,2 ± 0,18	100	1,95 ± 0,85	45	/	0			
ohne Glycerin	2,66 ± 0,01	100	0,67 ± 0,19	25	/	0			
Natriumascorbat									
20 mM	2,13 ± 0,01	100	1,93 ± 0,5	91	1,55 ± 0,4	73	/	0	
40 mM	2,14 ± 0,05	100	1,91 ± 0,01	90	1,34 ± 0,03	63	/	0	
80 mM	1,48 ± 0,2	100	1,25 ± 0,02	84	1,12 ± 0,09	76			
100 mM	1,48 ± 0,3	100	1,26 ± 0,1	85	1,19 ± 0,5	80			
20 mM*	5,14 ± 0,45	100	5,36 ± 0,23	104	4,10 ± 0,2	80	/	0	
40 mM*	4,86 ± 0,77	100	5,74 ± 0,34	118	2,94 ± 0,2	60	/	0	
80 mM*	3,9 ± 0,10	100	2,97 ± 0,10	76	2,06 ± 0,34	53			
100 mM*	3,4 ± 0,36	100	2,97 ± 0,32	87	2,06 ± 0,28	61			
Mercaptoethanol									
1,4mM #	1,62 ± 0,04	100	0,82 ± 0,11	51					
7 mM #	2,73 ± 0,30	100	1,17 ± 0,02	43					
14 mM #	3,26 ± 0,01	100	1,52 ± 0,03	47					

Tabelle 3.6-4: Aktivität der SPS bei Raumtemperatur mit NaCl haltigen Puffern bei 4-stündiger Inkubation. Aufgeführt sind die Mittelwerte der SPS-Aktivität aus zwei parallelen Wiederholungsexperimenten. Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-CoA Ester: *p*-Cumaroyl-CoA.

SPS-Aktivität [pkat·mg ⁻¹ Protein] und [% der Initialaktivität]					
NaCl	t = 0		t = 4 Stunden		
0 mM	2,10 ± 0,1	100	2,03 ± 0,36	97	
50 mM	2,58 ± 0,1	100	1,34 ± 0,05	52	
100 mM	2,59 ± 0,2	100	1,61 ± 0,06	62	

Ergebnisse

Eine Lagerung der SPS bei $\pm 4^\circ \text{C}$ konnte durch eine 20 % Glycerinzugabe die aktive Form des Enzyms 48 Stunden erhalten. Wurden 10 % Glycerin zum Lagerungspuffer gegeben, variierten die gemessenen Aktivitäten sehr stark. Es wurden zwischen 25 und 242 % der Initialaktivität ermittelt. Die Stabilität des Enzyms konnte auch nicht verbessert werden, indem die Proteinkonzentration durch BSA-Zugabe erhöht wurde. Mit 8 und 12 % der Anfangsaktivität nach 24 Stunden Lagerung liegen diese Werte deutlich unter den Aktivitätswerten ohne Zugabe von weiteren Proteinen zu der Lösung (siehe Tabelle 3.6-5).

Tabelle 3.6-5: Stabilität der SPS bei 4°C mit Glycerinzusatz und erhöhter Proteinkonzentration durch BSA Zugabe. Aufgeführt sind die Mittelwerte der SPS-Aktivität aus zwei parallelen Wiederholungsexperimenten.

Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-CoA Ester: Kaffeoyl-CoA, * *p*-Cumaroyl-CoA.

SPS-Aktivität [$\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$] und [% der Initialaktivität]						
Glycerinzusatz	t = 0		t = 24 Stunden		t = 48 Stunden	
10 % (V/V)	$4,11 \pm 0,17$	100	$9,94 \pm 0,08$	242	/	0
20 % (V/V)	$4,23 \pm 0,19$	100	$5,86 \pm 0,06$	139	$1,63 \pm 0,01$	22
10 % (V/V) *	$5,73 \pm 0,88$	100	$6,58 \pm 0,35$	115	*/	0
20% (V/V) *	$6,60 \pm 0,56$	100	$3,42 \pm 0,32$	52	$1,62 \pm 0,05$	25
ohne Glycerinzusatz	$2,67 \pm 0,02$	100	$0,76 \pm 0,11$	28	/	0
BSA						
0,5 % (w/w)	$8,84 \pm 0,17$	100	$0,71 \pm 0,02$	8	/	0
1 % (w/w)	$11,01 \pm 0,04$	100	$1,27 \pm 0,01$	12	$0,56 \pm 0,05$	6
ohne BSA Zugabe	$7,79 \pm 0,05$	100	$2,23 \pm 0,44$	12	/	0

Ergebnisse

Bei gereinigten Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie (siehe Abschnitt 2.9.3) wirkte sich ein Glycerinzusatz ebenfalls positiv auf die Enzymaktivität aus: bei 10% (V/V) Glycerinzusatz konnte nach zweistündiger Lagerung eine etwas erhöhte SPS-Aktivität festgestellt werden (+ 28 %), während der Zusatz von 20 % (V/V) Glycerin die SPS-Aktivität auf konstantem Niveau hielt. Ebenso hatte der pH-Wert des Aufbewahrungspuffers einen Einfluss auf die SPS-Aktivität: Ein pH-Wert von 6,5 steigerte die anfangs gemessene Aktivität um 86 %. Wurde der pH-Wert des Extraktionspuffer auf pH 7,0 erhöht, steigerte sich die Aktivität der SPS auf 103 %, während bei pH 8,0 die SPS-Aktivität auf 72 % der anfangs gemessenen Aktivität sank. Wiederholtes Schockgefrieren und Lagerung dieser gereinigten Fraktionen bei -80° wirkte sich um so mehr negativ auf die Aktivität aus je geringer konzentriert die Proteinlösung war (siehe Tabelle 3.6-6).

Tabelle 3.6-6: Stabilität der SPS in gereinigten Fraktionen. Einfluss des pH-Wertes, von Natriumascorbat- und Glycerinzugabe bei 4°C sowie wiederholtes Schockgefrieren und Lagerung bei -80°C . Messung der Enzymaktivität durch Detektion radioaktiver Produkte im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-CoA Ester: *p*-Cumaroyl-CoA, $n = 2$

SPS-Aktivität [$\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$] und [% der Initialaktivität]						
Glycerinzusatz	t = 0		t = 2 Stunden			
10 % (V/V)	$0,77 \pm 0,03$	100	$0,99 \pm 0,12$	128		
20 % (V/V)	$0,55 \pm 0,05$	100	$0,56 \pm 0,02$	102		
Natriumascorbat						
20 mM	$1,41 \pm 0,05$	100	$0,87 \pm 0,05$	62		
40 mM	$1,48 \pm 0,03$	100	$0,92 \pm 0,06$	62		
pH-Wert (20 mM Natriumascorbat, 10% Glycerin (V/V))						
6,5	$0,43 \pm 0,02$	100	$0,80 \pm 0,10$	186		
7,0	$0,35 \pm 0,01$	100	$0,71 \pm 0,05$	203		
8,0	$0,90 \pm 0,080$	100	$0,65 \pm 0,20$	72		
wiederholtes Schockgefrieren und Lagerung bei -80°C						
Protein			1 x		2 x	
$1,0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1,4 \pm 0,10$	100	$1,07 \pm 0,10$	76	$0,42 \pm 0,01$	30
$0,2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$5,6 \pm 0,05$	100	$2,69 \pm 0,08$	48		
$0,07\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$5,0 \pm 0,20$	100	$0,09 \pm 0,01$	1,8		

3.6.2 Löslichkeit der Styrylpyrconsynthase-Aktivität

Ob eine membrangebundene Form der Styrylpyrconsynthase in Gametophyten von *Equisetum arvense* L. vorliegt, wurde durch die Isolierung von Mikrosomen untersucht.

Ausgehend von $0,64 \pm 0,14$ mg Protein·g FG⁻¹ im Rohextrakt. Durchgeführt wurden fünf unabhängige Wiederholungsexperimente mit Detektion radioaktiver Reaktionsprodukte und ein Versuch mit HPLC-Detektion zur Identifizierung weiterer Nebenprodukte. Im Überstand der $100000 \times g$ Zentrifugation konnten circa $0,46 \pm 0,08$ mg Protein·g FG⁻¹ ($n = 3; \pm s$) gemessen werden.

Im Membransediment betrug der Proteingehalt $0,20 \pm 0,03$ mg Protein·g FG⁻¹ ($n = 3; \pm s$). Die Enzymaktivität der Styrylpyrconsynthase betrug im Rohextrakt $0,022 \pm 0,006$ pkat·mL⁻¹ ($n = 3; \pm s$). Im Überstand nach der Ultrazentrifugation wurden $0,029 \pm 0,002$ pkat·mL⁻¹ ($n = 3; \pm s$) Enzymaktivität gemessen. Im Membransediment konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Da die Gesamtaktivität der SPS im Überstand der Ultrazentrifugation erhalten blieb, war nachgewiesen, dass keine Membranbindung des Enzyms vorlag.

3.6.3 pH-Wert Abhängigkeit der Styrylpyrconsynthase

Für die Bestimmung des pH-Verhaltens wurde die SPS-Aktivität in verschiedenen Puffersystemen (Durchführung siehe Abschnitt 2.8.3) in einem Gesamt-pH-Bereich von pH 4,0 - pH 10,5 gemessen. Nach dem Vergleich verschiedener Puffersubstanzen wurde dann aufgrund der höchsten SPS-Aktivität in KP_i-Puffer eine aufgelöste pH-Abhängigkeit dargestellt (siehe Abbildung 3.6-1). Das pH-Optimum für die Bildung von Bisnoryangonin über *p*-Cumaroyl-CoA war bei pH 7,5-7,8 in KP_i-Puffer.

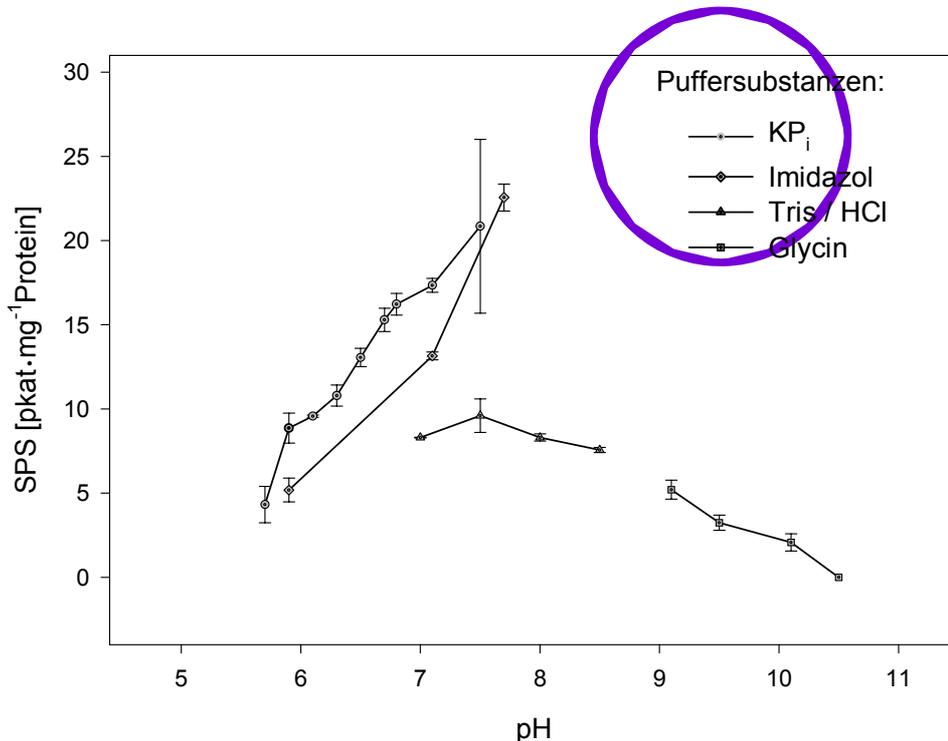


Abbildung 3.6-1: pH-Wert Abhängigkeit der SPS-Aktivität. Darstellung der spezifischen Aktivität in unterschiedlichen Puffersystemen, die zur Bildung von Bisnoryangonin mit *p*-Cumaroyl-CoA als zweitem Substrat führten ($n = 3; \pm s$).

Die Bildung von Hispidin über Kaffeoyl-CoA erreichte ein Optimum bei einem pH-Wert von 6,8-7,0 mit der höchsten Aktivität in Kaliumphosphat-Puffer (siehe Abbildung 3.6-2). Das pH-Verhalten der SPS zur Bildung von Hispidin über Kaffeoyl-CoA konnte nur in Kaliumphosphat-Puffer gemessen werden. In allen anderen verwendeten Puffersystemen konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Hydroxylierung von Bisnoryangonin zu Hispidin als Nebenreaktion zeigte die höchste Aktivität in Imidazolpuffer in einem pH-Bereich von 7,5-7,8 (ohne Abbildung).

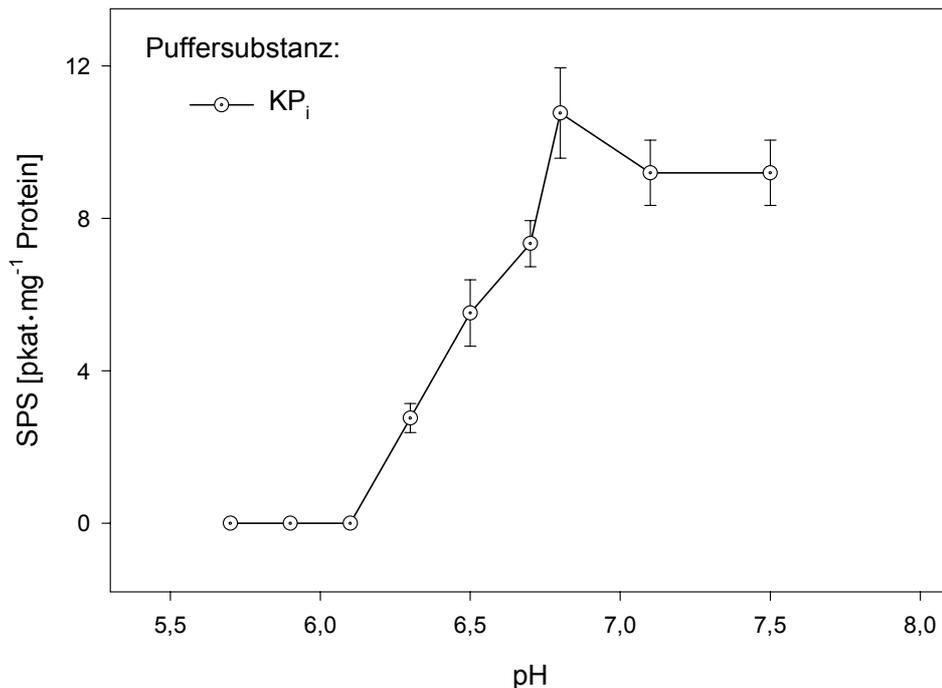


Abbildung 3.6-2: pH-Wert Abhängigkeit der SPS-Aktivität. Darstellung der spezifischen Aktivität in KP_i -Puffer, die zur Bildung von Hispidin mit Kaffeoyl-CoA als zweitem Substrat führt ($n = 3; \pm s$).

3.6.4 Temperaturabhängigkeit der Styrylpyronsynthese

Die Abhängigkeit der SPS-Aktivität von der Inkubationstemperatur bestimmt, als Bildungsrate von Hispidin bzw. Bisnoryangonin mit Kaffeoyl-CoA bzw. *p*-Cumaroyl-CoA als Zweitsubstrat, wurde in einem Temperaturbereich von 10 – 56 °C bestimmt. Bei der Bestimmung mit *p*-Cumaroyl-CoA als zweitem Substrat wurde die Enzymaktivität sowohl in $K-P_i$ Puffer pH 7,5 als auch in Tris/HCl pH 8,0 gemessen. Die Bildung von Hispidin über Kaffeoyl-CoA zeigt in Abhängigkeit von der Temperatur eine Optimumskurve mit einer Verzögerung des Anstiegs bei höheren Temperaturen und schließlich einen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit unter Durchlaufen eines Maximums bei 37 °C (100 %). Bei 30 °C betrug die SPS-Aktivität noch etwa 57 %, bei 45 °C 40 % des Maximums, siehe Abbildung 3.6-3. Für die Bildung von Bisnoryangonin über *p*-Cumaroyl-CoA ergab sich eine ähnliche

Ergebnisse

Kurve (Abbildung 3.6-4). Die höchste Aktivität wurde bei 30° C gemessen (100 %). Bei Raumtemperatur betrug die SPS-Aktivität noch 74 % und bei 45 °C 49 % des Maximums.

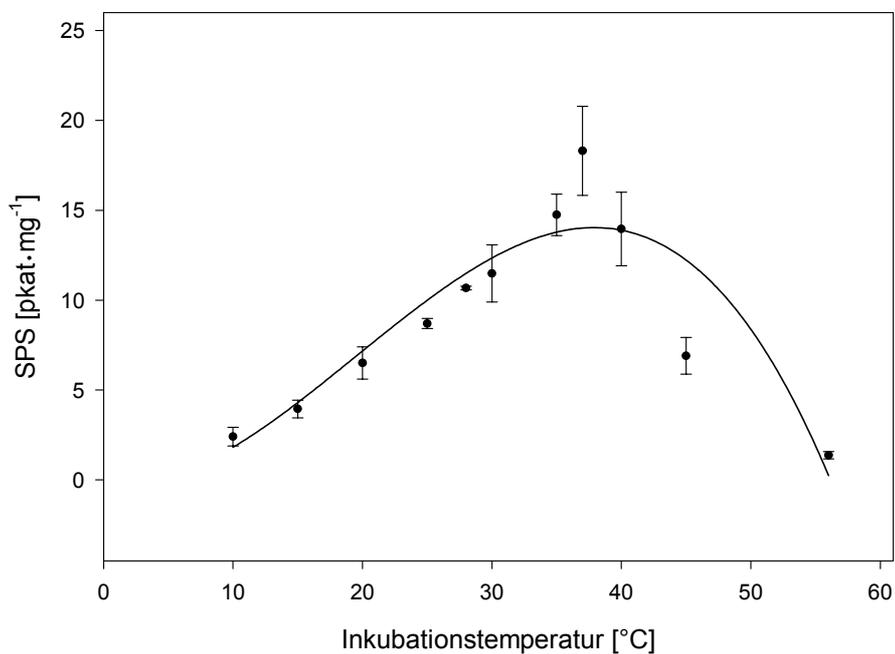


Abbildung 3.6-3: Temperaturabhängigkeit der Styrylpyronsynthese, Bildung von Hispidin in KP_i -Puffer, pH 6,8 (n = 3; \pm s).

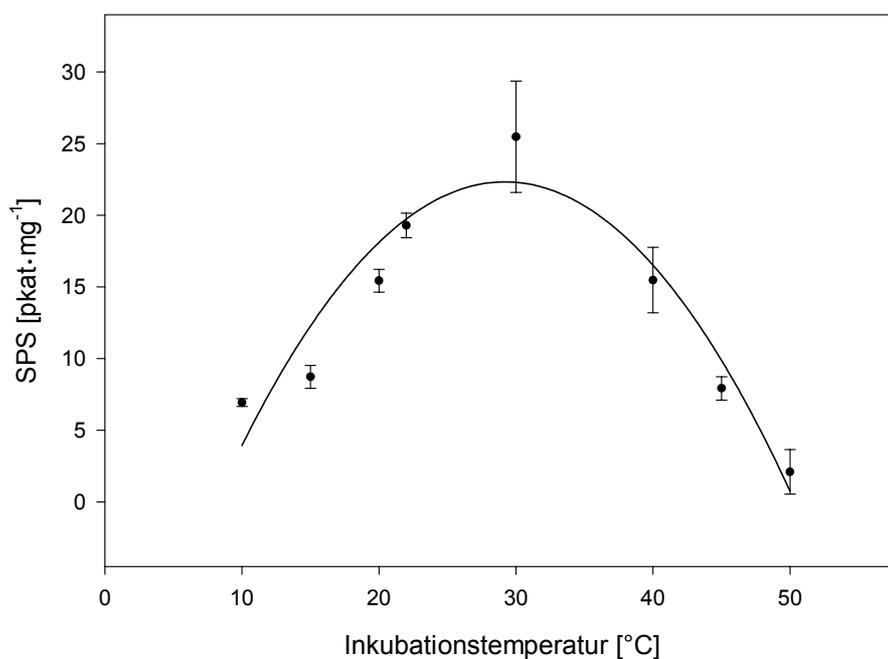


Abbildung 3.6-4: Temperaturabhängigkeit der Styrylpyronsynthese, Bildung von Bisnoryangonin in $K-P_i$ -Puffer, pH 7,5 (n = 3; \pm s).

Ergebnisse

Außerhalb der Denaturierungsphase ergab die Auftragung des Logarithmus der katalytischen Konstante k gegen die reziproke absolute Temperatur eine lineare Abhängigkeit. Diese wird durch folgende Geradengleichung beschrieben, die man durch Logarithmieren der empirischen Arrhenius-Gleichung erhält (BISSWANGER 1994):

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \text{ bzw. } \ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

k : katalytische Konstante

V_{\max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit die für k eingesetzt werden kann, bei Substratsättigung

E_a : Aktivierungsenergie

R : allgemeine Gaskonstante $8,32 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

T : absolute Temperatur

A : Konstante A

Aus dem linearen Teil der Auftragung wurde jeweils über einen Bereich von $10 \text{ }^\circ\text{C}$ die apparente Aktivierungsenergie aus der Geradensteigung bestimmt (siehe Abbildung 3.6-5 und

Abbildung 3.6-6): Sie beträgt für die Umsetzung von Malonyl-CoA mit Kaffeoyl-CoA $50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und für die Umsetzung von Malonyl-CoA mit p -Cumaroyl-CoA: $49 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

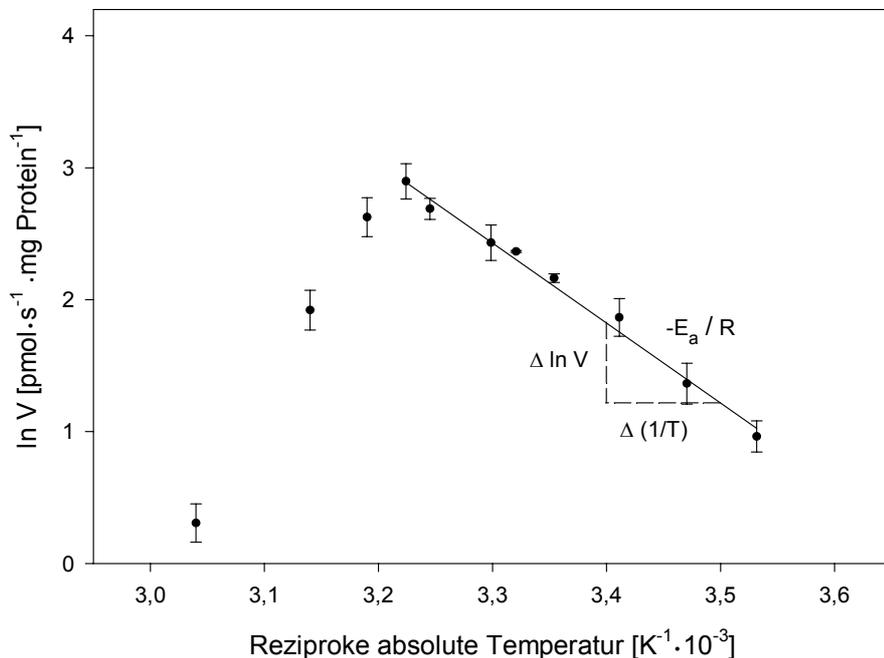


Abbildung 3.6-5: Arrhenius-Auftragung zur Ermittlung der empirischen Aktivierungsenergie E_a mit $-E_a = \frac{\Delta \ln V}{\Delta T^{-1}} = 8,32 \frac{-0,60}{10^{-4}} = -50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ für die Umsetzung von Malonyl-CoA mit Kaffeoyl-CoA ($n = 3; \pm s$).

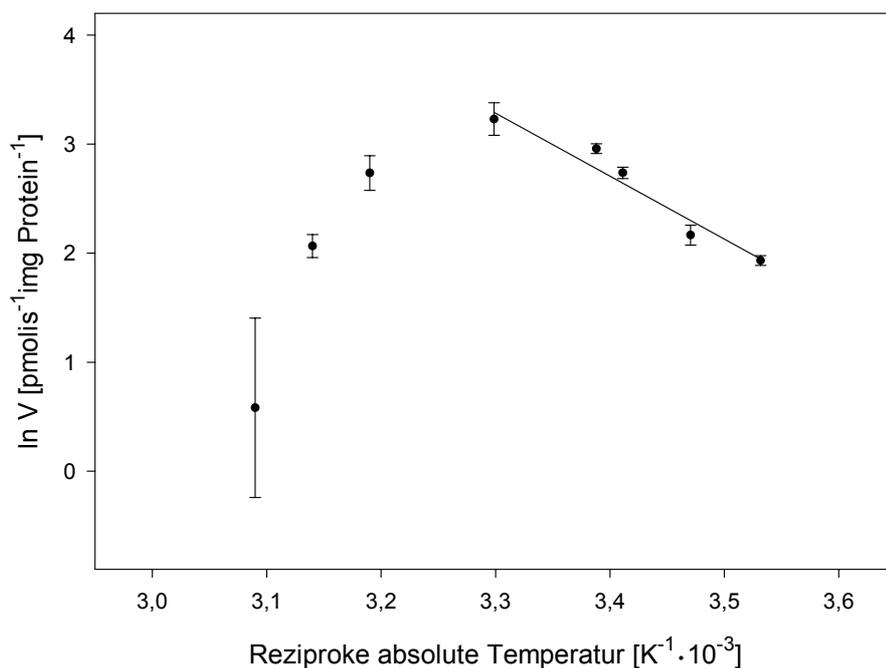


Abbildung 3.6-6: Arrhenius-Auftragung zur Ermittlung der empirischen Aktivierungsenergie E_a bei der Umsetzung von Malonyl-CoA und *p*-Cumaroyl-

CoA: $-E_a = \frac{\Delta \ln V}{\Delta T^{-1}} = 8,32 \frac{-0,59}{10^{-4}} = -49 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ in K-P_i Puffer ($n = 3; \pm s$).

Beim Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten für die Bildung des Bismoryangonin in K-P_i Puffer pH 7,5 und Tris Puffer pH 8 ergab sich das gleiche Maximum der Reaktion bei 30 °C (ohne Abbildung). In Tris/HCl Puffer konnte eine höhere spezifische Aktivität festgestellt werden: 30 $\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ zu 26 $\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ in K-P_i pH 7,5 (vgl. Abschnitt pH-Wert Einfluss auf die SPS-Aktivität). Die spezifische Aktivität lag bei der Umsetzung von *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA um den Faktor 1,6 höher als bei der Umsetzung von Kaffeoyl-CoA im Maximum.

3.6.5 Zeit- und Proteinabhängigkeit

Zeitabhängigkeit

Ein linearer Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer und Hispidinbildung besteht bis zu 60 min gewählter Inkubationsdauer. Der anschließende Rückgang der Enzymaktivität lässt sich höchstwahrscheinlich auf die Hemmung der Aktivität durch entstandenes Produkt zurückführen (siehe Abbildung 3.6-7). Eine thermische Zersetzung des Hispidins konnte durch Inkubation einer Hispidinlösung über diese Zeiträume ausgeschlossen werden (Ergebnisse ohne Abbildung).

Ergebnisse

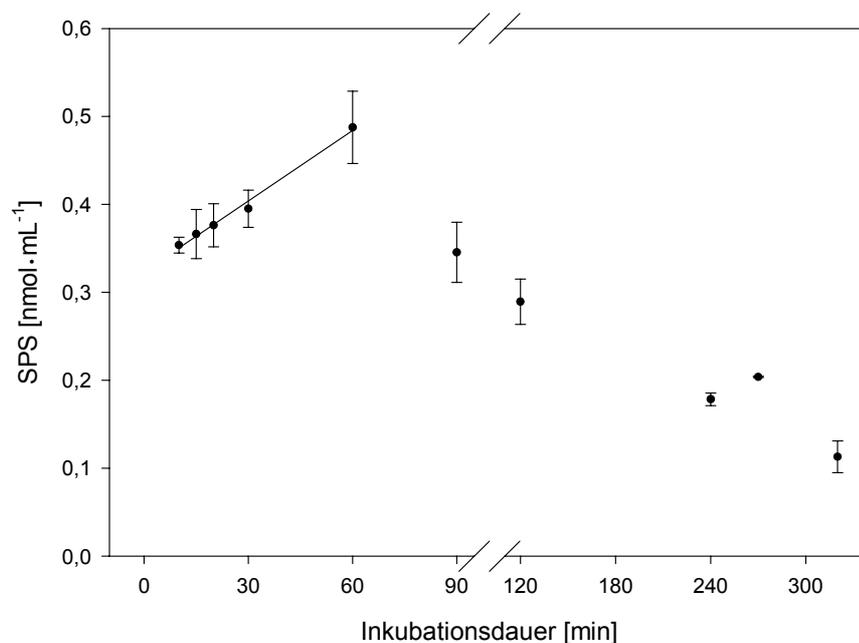


Abbildung 3.6-7: Zeitabhängigkeit der SPS, im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-ester: Kaffeoyle-CoA. (n = 3; ± s).

Proteinabhängigkeit

Eine lineare Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion von der Proteinmenge als zweites Kriterium für einen gültigen Enzymtest konnte nachgewiesen werden. Ammoniumsulfatgefällte anschließend entsalzte und konzentrierte Proteinfractionen (siehe Abschnitt 2.8.6) zeigten eine Linearität von 35 µg bis 120 µg Protein im *in-vitro* Enzymtest (siehe Abbildung 3.6-8).

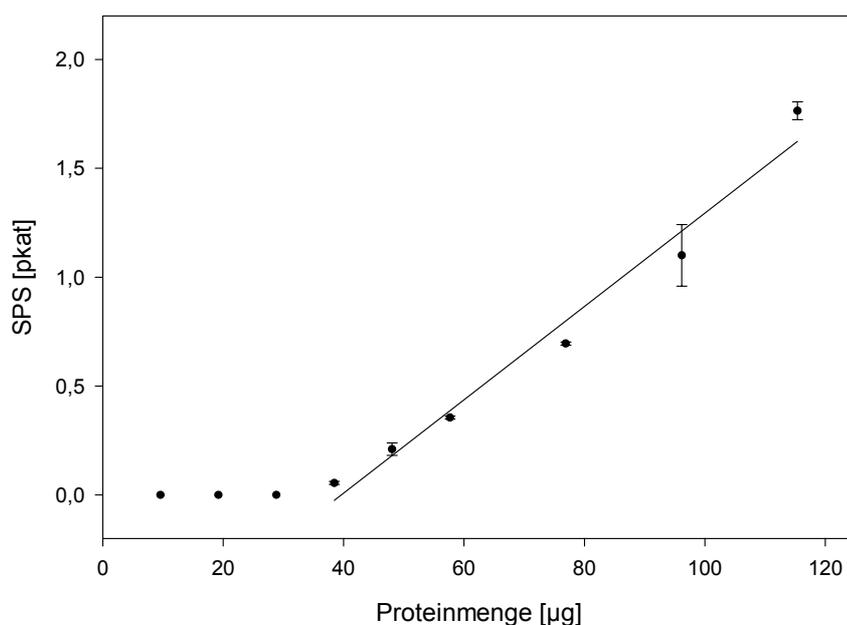


Abbildung 3.6-8: Proteinabhängigkeit der SPS. Die Versuche wurden mit Proteinextrakten aus einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von 35-70% durchgeführt (n = 3; ± s). Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-ester: Kaffeoyle-CoA.

Ergebnisse

Nach Bestimmung des optimalen Ammoniumsulfatfällungsbereich (siehe Abschnitt 3.5.2) konnte der enzymatische Nachweis der Hispidinbildung bereits bei 5 µg eingesetztem Protein im Test erfolgen. Eine Erhöhung der Proteinmenge auf mehr als 50 µg führte nicht mehr zu einer Steigerung der Enzymaktivität (siehe Abbildung 3.6-9).

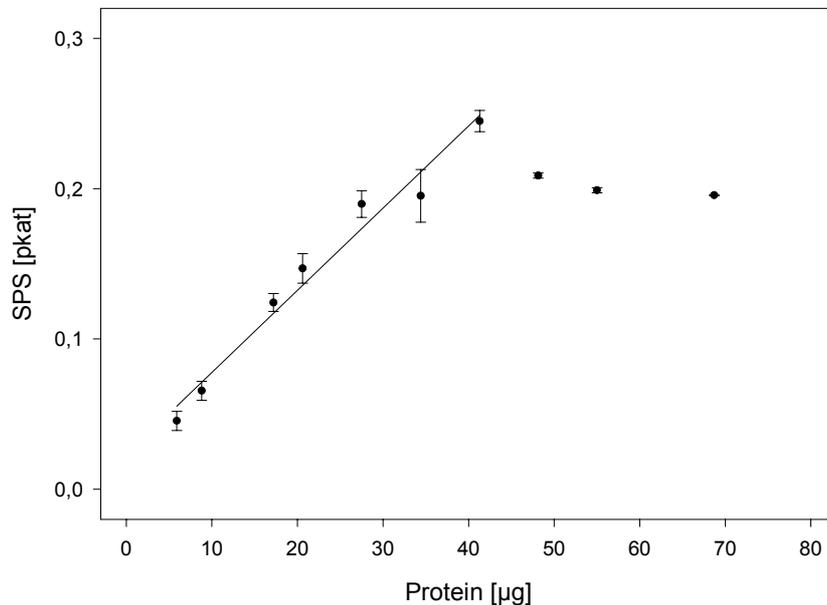


Abbildung 3.6-9: Proteinabhängigkeit der SPS. Die Versuche wurden mit Proteinextrakten aus einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von 30-65% durchgeführt (n = 3; ± s). Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-ester: Kaffeoylester-CoA.

3.6.6 Einfluss verschiedener Substanzen auf die SPS-Aktivität

Natriumascorbat

Der Einfluss von Natriumascorbat auf die Enzymaktivität wurde mit Standard-Proteinextrakten gemessen (Durchführung siehe Abschnitt 2.8.4). Dabei wurden die ammoniumsulfatgefällten Proteinniederschläge in einem K-P_i-Puffer ohne Zusätze gelöst und ebenfalls in diesen Puffer über PD-10 zur Entsalzung überführt. Danach erfolgte die unterschiedliche Natriumascorbatzugabe. Ohne Natriumascorbatzugabe erfolgte keine enzymatische Reaktion. Die unterschiedlichen Konzentrationen konnten aber die Aktivität des Enzyms nicht wesentlich beeinflussen. Eine Konzentration von 20 mM erwies sich als optimal (vgl. Tabelle 3.6-7 und siehe Abbildung 3.6-10) und wurde für die weiteren Versuche übernommen.

Rinderserumalbumin (BSA)

BSA im *in-vitro* Enzymtest, getestet von 0,1 % (w/V) bis 1 % (w/V) mit jeweils 20 mM Natriumascorbat bewirkte eine kontinuierliche Steigerung der Enzymaktivität. Bereits bei Zugabe von 0,1 % (w/V) BSA wurde eine Aktivitätserhöhung um 70 % gegenüber dem Test

Ergebnisse

ohne BSA gemessen. Insgesamt konnte eine Steigerung der Aktivität um über 200 % erreicht werden (vgl. Tabelle 3.6-7 und siehe Abbildung 3.6-10).

Mercaptoethanol

Mercaptoethanolzugabe beeinflusste die SPS-Aktivität deutlich ab einer Konzentration von 5,6 mM im Test konnte eine Aktivitätssteigerung um über 100 % erreicht werden. Die optimale Konzentration war 7 mM. Bei Konzentrationen zwischen 7 und 21 mM ließen sich, verglichen mit einer 7 mM Konzentration, geringere spezifische Aktivitäten ermitteln (vergleiche Tabelle 3.6-7 und siehe Abbildung 3.6-10).

Dithiothreitol (DTT)

Alternativ zu Mercaptoethanol wurde Dithiothreitol (DTT) getestet. In einer Konzentration von 2,5 mM ergab sich eine Aktivitätssteigerung um über 300 %. Im Vergleich zu Mercaptoethanol konnten höhere spezifische Aktivitäten gemessen werden (vgl. Tabelle 3.6-7 und siehe Abbildung 3.6-10). In weiteren Enzymtests wurde Mercaptoethanol durch DTT in einer Konzentration von 2,5 mM ersetzt.

Tabelle 3.6-7: Einfluss von Natriumascorbat, DTT, BSA und Mercaptoethanol auf die enzymatische Aktivität der SPS. Aufgeführt sind die Mittelwerte der Aktivitätsbestimmung von jeweils drei Parallelversuchen ($n = 3; \pm s$). Neben diesen Werten ist die Enzymaktivität in % angegeben, wobei jeweils die Aktivität ohne den Zusatz als 100% festgelegt wurde. #: Zusatz von 20 mM Natriumascorbat

SPS-Aktivität			SPS-Aktivität		
<u>Natriumascorbat</u> [mM]	[pkat·mg ⁻¹ Protein]	[%]	<u>DTT</u> [mM]	[pkat·mg ⁻¹ Protein]	[%]
0	2,38 ± 0,05	100	0	2,42 ± 0,21	100
6	2,17 ± 0,89	91	1,25	9,28 ± 1,02	384
10	2,67 ± 0,29	112	2,50	11,50 ± 0,07	476
20	3,48 ± 0,05	146	2,50	13,41 ± 0,48	555
40	1,46 ± 0,19	61	mit 0,1% (w/V) BSA		

SPS-Aktivität			SPS-Aktivität		
<u>Mercaptoethanol</u> [mM]	[pkat·mg ⁻¹ Protein]	[%]	<u>BSA</u> (w/V) [%]	[pkat·mg ⁻¹ Protein]	[%]
0	2,42 ± 0,15	100	0	6,15 ± 0,17	100
0,42	2,55 ± 0,21	106	0,1	9,90 ± 0,39	169
2,1	2,73 ± 0,06	113	0,2	13,50 ± 0,89	219
4,2	2,99 ± 0,01	124	0,3	13,81 ± 1,50	224
5,6	5,68 ± 0,60	210	0,4	16,15 ± 0,03	275
7	8,64 ± 0,07	357	0,6	16,30 ± 1,29	265
14	7,08 ± 0,84	293	0,8	17,81 ± 0,41	290
21	4,05 ± 2,50	168	1	19,80 ± 0,51	322

Ergebnisse

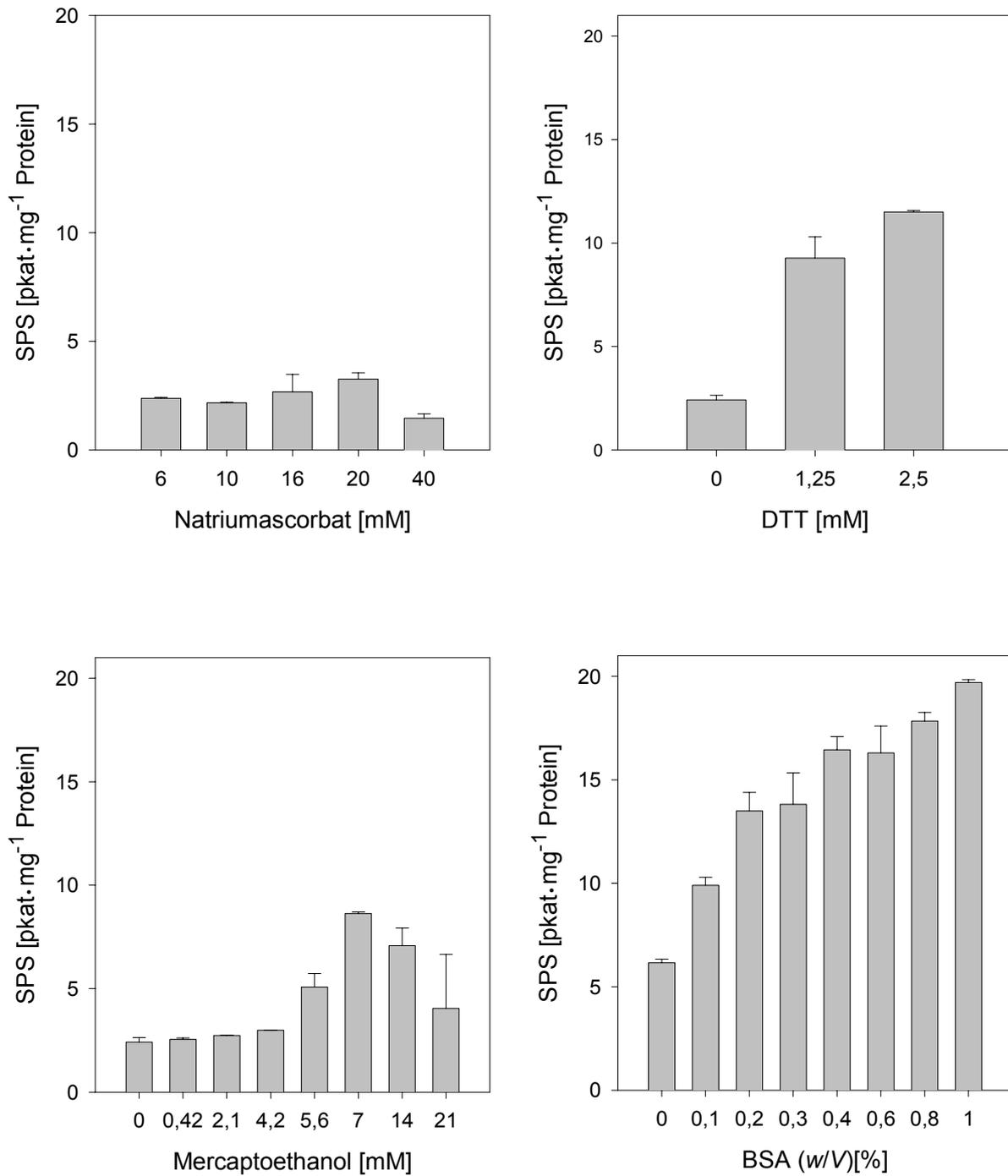


Abbildung 3.6-10: Einfluss von Natriumascorbat, DTT, Mercaptoethanol und BSA auf die enzymatische Aktivität der SPS im *in-vitro*-Enzymtest. Der Abbildung liegen die Bestimmung der Mittelwerte aus jeweils drei Parallelversuchen zugrunde (n = 3; ± s).

3.6.7 Substratabhängigkeit und Bestimmung der K_m -Werte für Kaffeoyl-CoA, *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA

Da es sich bei der SPS-Bildung um eine Zweisubstratreaktion handelt, musste für die Bestimmung der kinetischen Parameter eines Substrates das andere im Überschuss vorliegen. In Vorversuchen wurden die Sättigungskonzentrationen für alle Substrate (Malonyl-CoA, Kaffeoyl-CoA bzw. *p*-Cumaroyl-CoA) bestimmt und diese dementsprechend in die Messreihen eingesetzt. Ebenso wurde in Vorversuchen die Zeitlinearität für geringe Substrat-Konzentrationen bestimmt und die Messreihen daraufhin angeglichen (ohne Abbildung).

Die apparente Michaeliskonstante (K_m -Wert) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) wurden jeweils sowohl durch Angleichung der Messdaten an die Michaelis-Menten-Gleichung als auch durch Linearisierung der in den dargestellten Sättigungskurven (siehe Abbildung 3.6-11, Abbildung 3.6-12, Abbildung 3.6-13, Abbildung 3.6-14) nach Hanes und Lineweaver-Burk (BISSWANGER 1994) berechnet (Durchführung siehe Abschnitt 2.8.5).

Kaffeoyl-CoA

Bei konstant gesättigter Malonyl-Konzentration von 1 mM wurde die Kaffeoyl-CoA Konzentration von 25 bis 700 μM variiert. Bis 500 μM war eine Aktivitätszunahme zu beobachten, danach trat eine Sättigung der Reaktion ein. Der apparente K_m -Wert für Kaffeoyl-CoA wurde mit 116 μM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit 27 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$ bestimmt (siehe Abbildung 3.6-11). In der Auftragung nach Hanes konnte eine Michaeliskonstante von 153 μM , nach Lineweaver-Burk ein Wert von 262 μM ermittelt werden. Mit einer Abweichung von $r^2 = 0,996$ zeigten die Messwerte in der Darstellung nach Hanes eine bessere Übereinstimmung mit der Regressionsgeraden als in der Darstellung nach Lineweaver-Burk ($r^2 = 0,969$). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde nach Hanes mit 27 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$, nach Lineweaver-Burk mit 40 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ bestimmt.

Malonyl-CoA

Bei konstant gesättigter Kaffeoyl-CoA bzw. *p*-Cumaroyl-CoA Konzentration von 400 μM wurde die Malonyl-CoA Konzentration von 25 μM bis 1200 μM variiert. Es ergab sich eine Sättigungskinetik mit maximaler Reaktionsgeschwindigkeit von 17 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$ bzw. 18 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$. Der apparente K_m -Wert für Malonyl-CoA betrug 141 μM bzw. 238 μM . Ab einer Substratkonzentration von 1200 μM trat bei der Reaktion von Malonyl-CoA mit *p*-Cumaroyl-CoA eine Substrathemmung auf, die bei der Reaktion von Malonyl-CoA mit Kaffeoyl-CoA nicht beobachtbar war. Die Aktivität sank auf 80 % des Maximalwertes. (siehe Abbildung 3.6-12 und Abbildung 3.6-13). In der Auftragung nach Hanes konnte eine Michaeliskonstante von 129 μM bzw. 187 μM , nach Lineweaver-Burk ein Wert von 166 μM bzw. 152 mM ermittelt werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde nach Hanes mit 17 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ bzw. 27 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$, nach Lineweaver-Burk mit 17 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ bzw. 12 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ bestimmt. Mit einer Abweichung von $r^2 = 0,991$ zeigten die Messwerte für die Umsetzung von Malonyl-CoA mit Kaffeoyl-CoA nach Hanes eine bessere Übereinstimmung mit der Regressionsgeraden als bei der Darstellung nach Lineweaver-Burk. Bei der Umsetzung von

Ergebnisse

p-Cumaroyl-CoA mit Malonyl-CoA lieferten die Messwerte eine bessere Übereinstimmung mit Lineweaver-Burk ($r^2 = 0,999$).

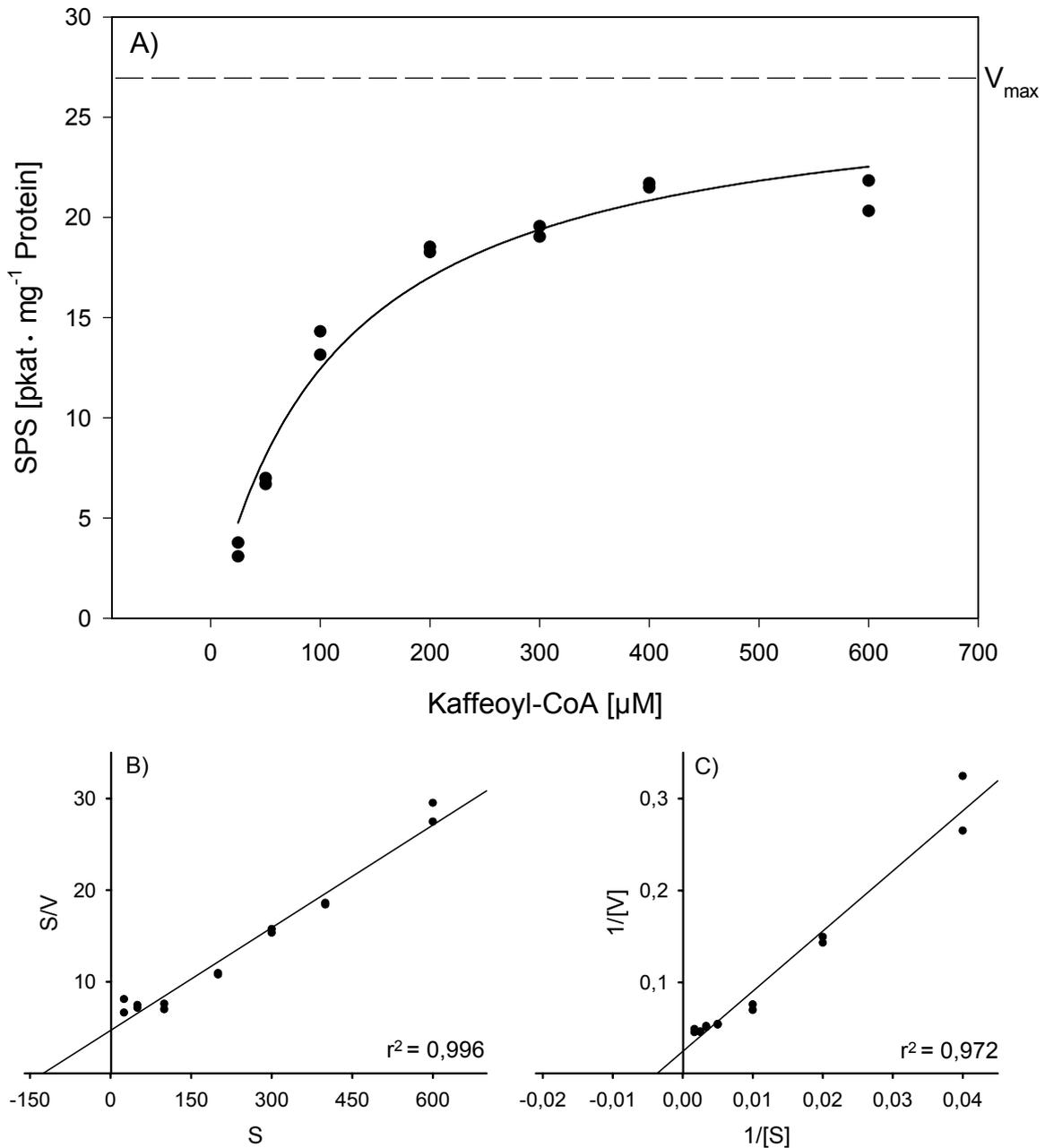


Abbildung 3.6-11: Kaffeoyl-CoA-Abhängigkeit der SPS-Aktivität bei fester Malonyl-CoA-Konzentration von 1 mM. A) Michaelis-Menten-Kurve, B) Linearisierung der oben dargestellten Sättigungskurve nach Hanes. Der K_m ist als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesbar. C) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Der K_m ist der reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse.

Ergebnisse

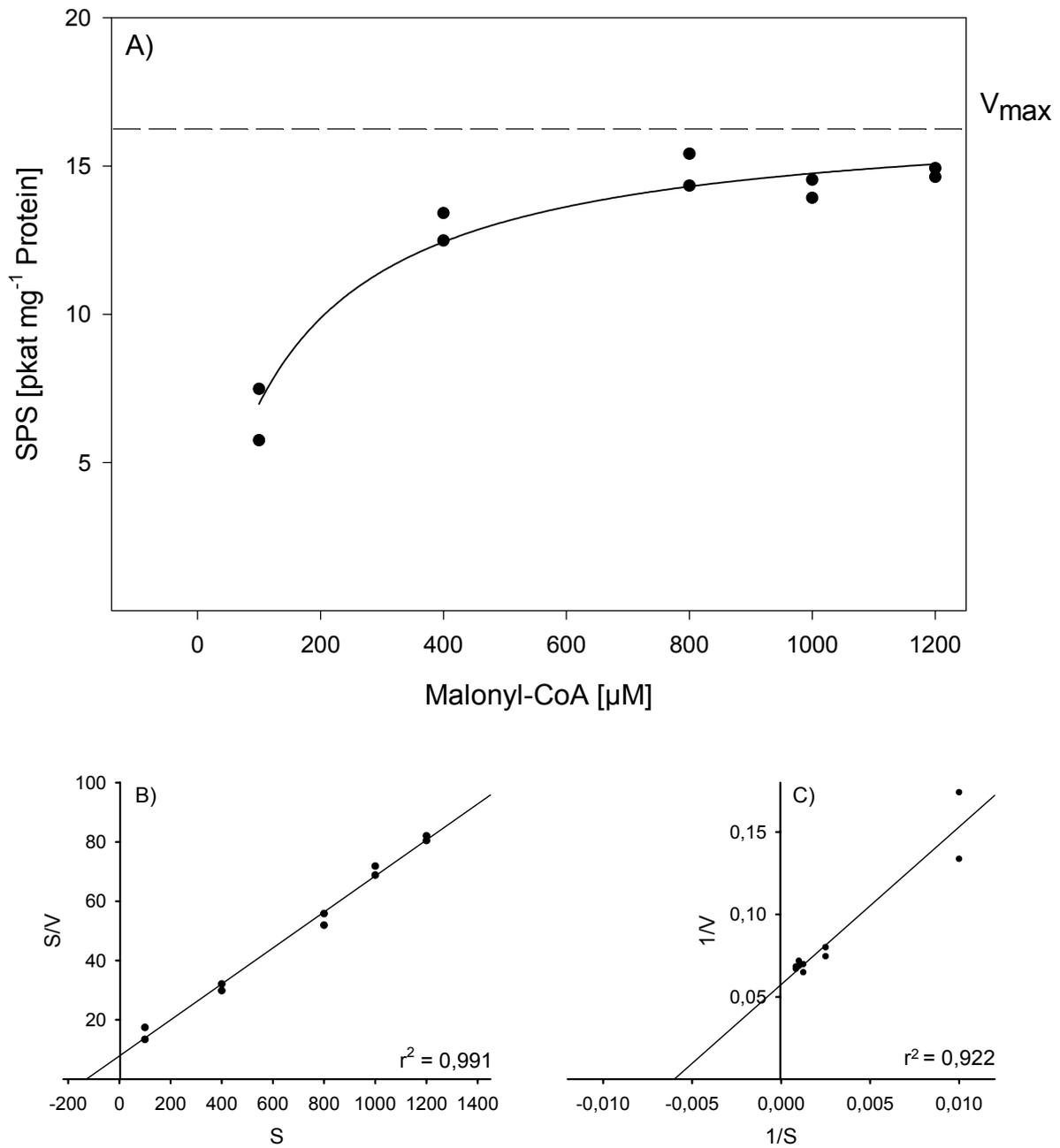


Abbildung 3.6-12: Malonyl-CoA-Abhängigkeit der SPS-Aktivität bei fester Kaffeyl-CoA-Konzentration von 400 μM. A) Michaelis-Menten-Kurve, B) Linearisierung der oben dargestellten Sättigungskurve nach Hanes. Der K_m ist als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesbar. C) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Der K_m ist der reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse.

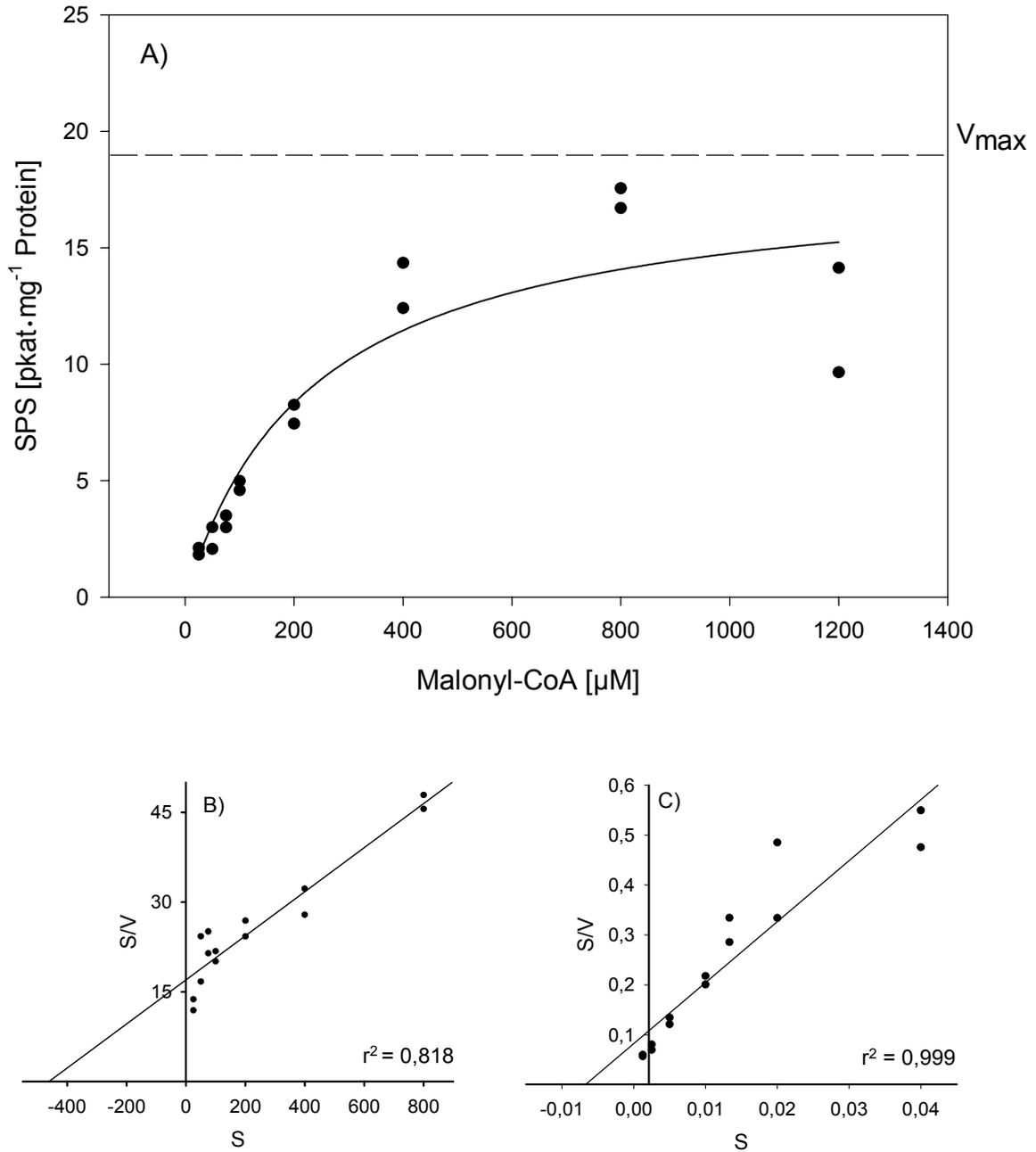


Abbildung 3.6-13: Malonyl-CoA-Abhängigkeit der SPS-Aktivität bei fester *p*-Cumaroyl-CoA-Konzentration von 400 μM. A) Michaelis-Menten-Kurve, B) Linearisierung der oben dargestellten Sättigungskurve nach Hanes. Der K_m ist als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesbar. C) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Der K_m ist der reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse.

p-Cumaroyl-CoA

Bei konstant gesättigter Malonyl-CoA Konzentration von 1 mM wurde die *p*-Cumaroyl-CoA Konzentration von 25-700 μM variiert. Es ergab sich eine Sättigungskinetik mit maximaler Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} ab etwa 600 μM von 50 $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein. Der apparente K_m -Wert für *p*-Cumaroyl-CoA betrug 182 μM . Ab einer Substratkonzentration von 600 μM trat eine Substrathemmung auf. Die Aktivität sank auf 74 % des Maximalwertes (siehe Abbildung 3.6-14). In der Auftragung nach Hanes konnte eine Michaelis-Konstante von 190 μM ermittelt werden, nach Lineweaver-Burk 52 μM . Mit einer Abweichung von $r^2 = 0,999$ zeigten die Messwerte in der Darstellung nach Lineweaver-Burk eine bessere Übereinstimmung mit der Regressionsgeraden als in der Darstellung nach Hanes ($r^2 = 0,992$).

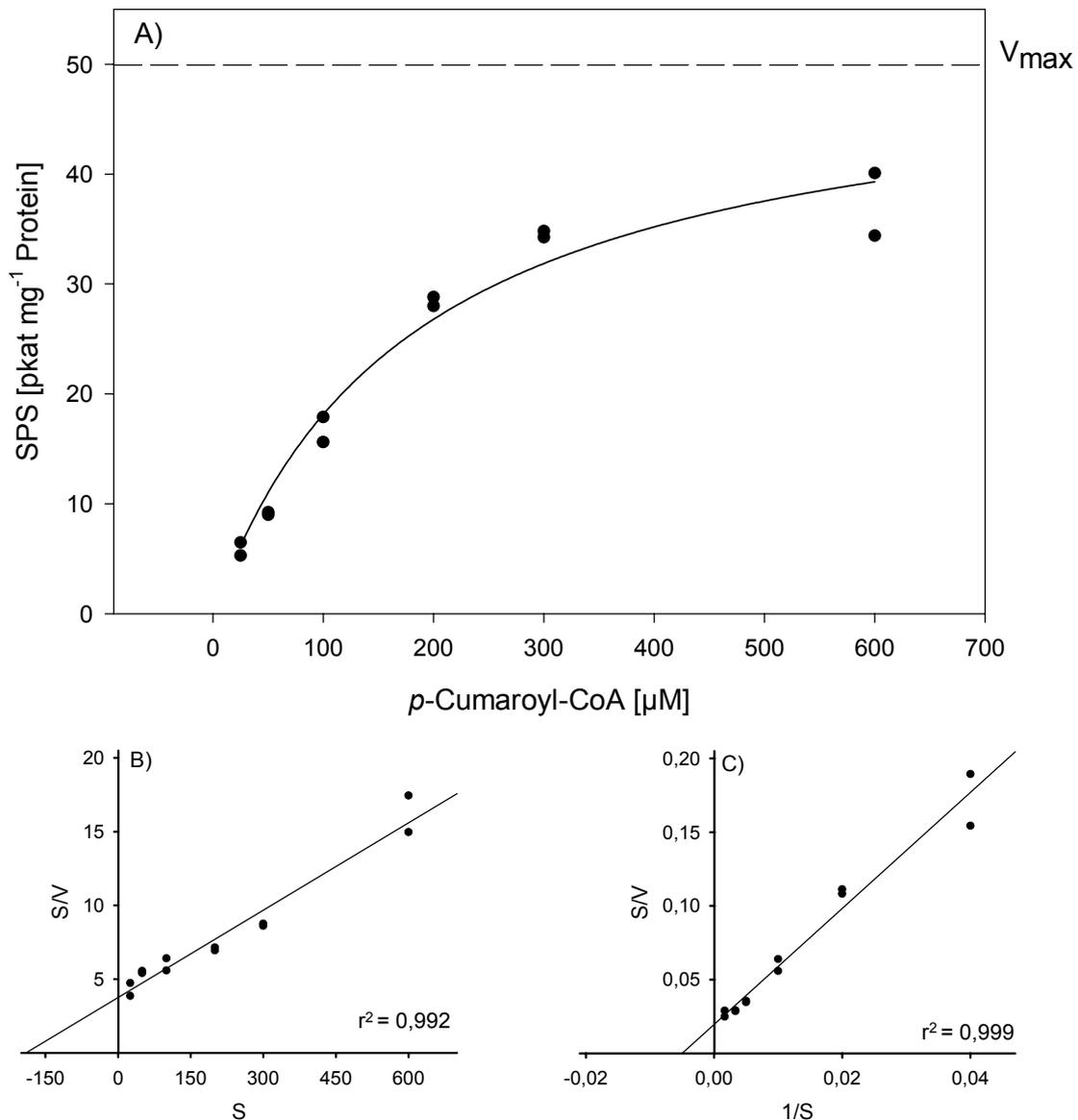


Abbildung 3.6-14: *p*-Cumaroyl-CoA-Abhängigkeit der SPS-Aktivität bei fester Malonyl-CoA-Konzentration von 1 mM. A) Michaelis-Menten-Kurve, B) Linearisierung der oben dargestellten Sättigungskurve nach Hanes. Der K_m ist als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesbar. C) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Der K_m ist der reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse.

3.6.8 Molekulargewicht

Das apparente Molekulargewicht M_r des nativen Enzyms wurde durch Gelfiltration an zwei unterschiedlichen Chromatographiematerialien unabhängig voneinander bestimmt. Zum einen wurde eine Gelfiltration an Sephacryl S-200 und zum anderen an Superose 12 HR (FPLC) jeweils mit angereinigten SPS-Proben durchgeführt. Die Säulen wurden mit Molekulargewichtsstandards in je drei Eichläufen kalibriert (siehe Tabelle 3.6-8). Nach Chromatographie der SPS-Proben wurde die SPS-Aktivität in den Fraktionen bestimmt (Detektion der radioaktiv markierten Produkte, siehe Abschnitt 2.7.2.3). Das mittlere Volumen der Fraktion mit der höchsten SPS-Aktivität wurde als V_e (Elutionsvolumen) angenommen. Die k_{av} -Werte der Molekulargewichtsmarker wurden in Abbildung 3.6-15 und Abbildung 3.6-16 gegen den dekadischen Logarithmus der entsprechenden Molekulargewichte aufgetragen. Das Elutionsprofil der SPS mit den Elutionsmaxima V_e 46,25 mL (k_{av} : 0,125) für Sephacryl S-200 und V_e : 12,75 mL (k_{av} : 0,958) für Superose 12 HR ist in den Abbildungen eingefügt. Aus der linearen Regression der Eichungen wurde für die SPS ein Molekulargewicht von 78-80 kDa berechnet.

Tabelle 3.6-8: Molekulargewichte (M_r), dekadische Logarithmen der Molekulargewichte ($\log M_r$) und Verteilungskoeffizient k_{av} der verwendeten Eichproteine nach Auftrennung an Sephacryl S-200 und an Superose 12 HR.

Auftrennung an Sephacryl S-200

Eichsubstanz	M_r [Da]	$\log M_r$	k_{av}
Aldolase	158000	5,20	$0,054 \pm 0,004$
<i>Styrylpyronsynthase</i>	$75 \text{ kDa} \pm 2$	$4,87 \pm 0,02$	$0,134 \pm 0,006$
Albumin	67000	4,83	$0,125 \pm 0,001$
Ovalbumin	43000	4,63	$0,192 \pm 0,001$
Chymotrypsinogen	25000	4,40	$0,265 \pm 0,007$

Auftrennung an Superose 12 HR

Eichsubstanz	M_r [Da]	$\log M_r$	k_{av}
Ferritin	440000	5,64	$0,583 \pm 0,003$
Katalase	232000	5,37	$0,792 \pm 0,005$
Aldolase	158000	5,20	$0,866 \pm 0,002$
<i>Styrylpyronsynthase</i>	$76 \text{ kDa} \pm 5$	$4,88 \pm 0,02$	$0,926 \pm 0,04$
Albumin	67000	4,83	$0,958 \pm 0,001$
Ovalbumin	43000	4,63	$1,042 \pm 0,002$

Ergebnisse

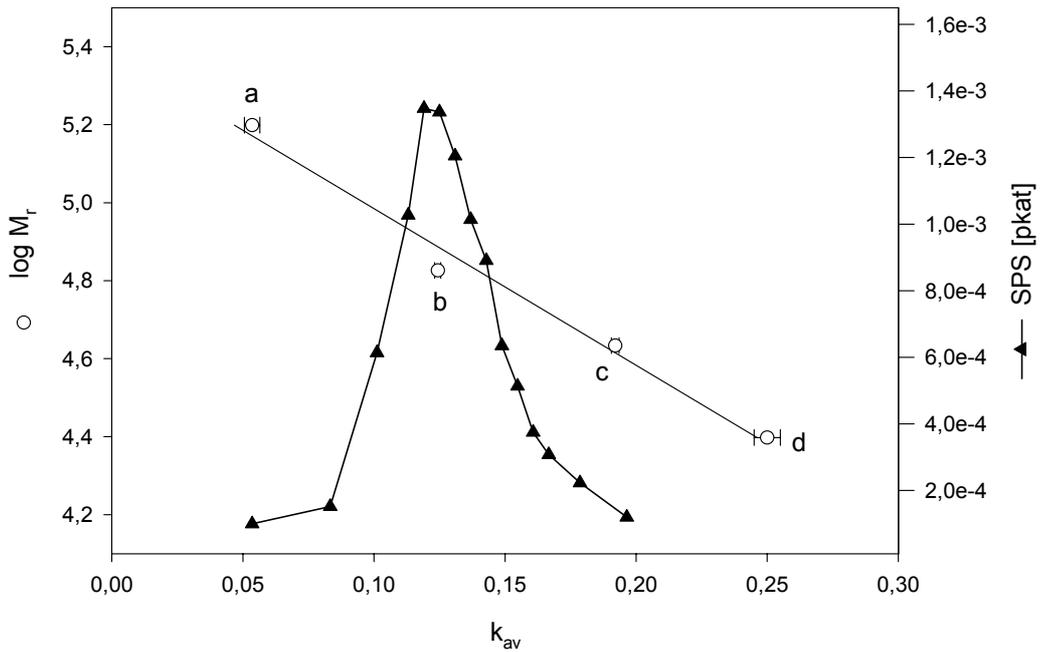


Abbildung 3.6-15: Molekulargewichtsbestimmung der SPS durch Gelfiltration an Sephacryl S-200. Die Eichproteine sind Aldolase (a), Albumin (b), Ovalbumin (c) und Chymotrypsinogen (d) (vergleiche Tabelle 3.6-8). Lineare Regression ($y = ax+b$): $r^2 = 0,985$; $a = 1,34$; $b = -0,249$.

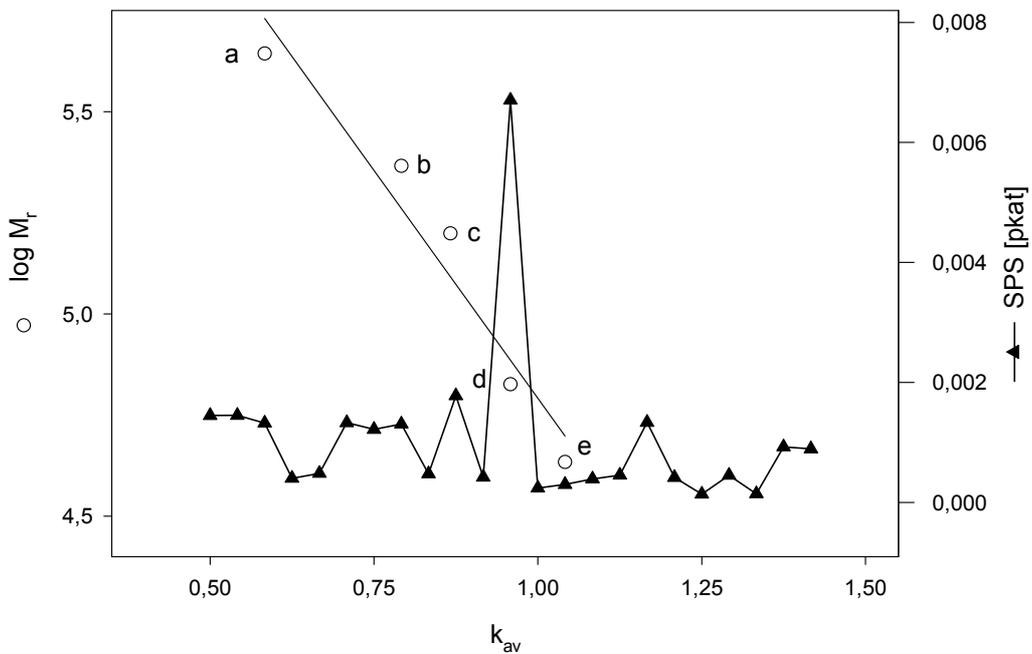


Abbildung 3.6-16: Molekulargewichtsbestimmung der SPS durch Gelfiltration an Superose 12 HR. Die Eichproteine sind Ferritin (a), Katalase (b), Aldolase (c), Ovalbumin (d) und Chymotrypsinogen (e) (vergleiche Tabelle 3.6-8). Lineare Regression ($y = ax+b$): $r^2 = 0,945$; $a = 7,04$; $b = -2,252$.

3.7 Chromatographische Reinigung der Styrylpyrronsynthase

3.7.1 Test und Optimierung einzelner chromatographischer Schritte

Für die Reinigung des Styrylpyrronsynthase-Enzymproteins (SPS) wurden zunächst verschiedene chromatographische Einzelschritte mit unterschiedlichen Trennprinzipien auf ihre Effizienz hin getestet. Berücksichtigt wurden der Anreicherungsfaktor (die Zunahme der spezifische Aktivität [$\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein] nach einem Reinigungsschritt), der Erhalt der Gesamtaktivität (die Enzymaktivität in [pkat] bezogen auf das jeweilig vorhandene Volumen, berechnet als % zum vorherigen Reinigungsschritt) und die Proteinausbeute im folgenden Schritt jeweils als Prozentangabe aufgeführt. Zum Einsatz kamen Ionenaustauschchromatographie, Hydrophoben-Interaktionschromatographie, Chromatographie an Hydroxylapatit und Gelfiltrationschromatographie. Dabei wurde von einer mit 35-60 % Ammoniumsulfat gefällten Fraktion der Gametophytenextrakte von *Equisetum arvense* L. ausgegangen und verschiedene Chromatographieschritte hinsichtlich Anreicherung und Ausbeute optimiert, um aus den daraus erhaltenen Ergebnissen Reinigungssequenzen abzuleiten.

3.7.1.1 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltration beruht auf der unterschiedlichen Verteilung der Proteinmoleküle zwischen einem Gelkompartiment und dem umgebenden Medium. Verwendet wird eine Gruppe von organischen Polymeren, die ein dreidimensionales Netzwerk von Poren ausbilden. Große Moleküle, welche die Poren nicht passieren können, eluieren im Totvolumen der Säule, kleinere Moleküle verteilen sich zwischen den mobilen Phasen innerhalb und außerhalb des Molekularsiebs und eluieren deutlich langsamer (RODBARD 1970, WILSON 1994).

Gelfiltration an Superose 12/HR[®]

Die Gelfiltration an Superose 12/HR[®] wurde zur Reinigung verschiedener Proteinfractionen herangezogen. Die SPS eluierte mit einem Peak bei einem Maximum der Enzymaktivität nach einem Elutionsvolumen von 13,5-14,0 mL (siehe Abbildung 3.7-1). Bei dreimaliger separater Injektion von 200 μL Enzymextrakt wurden jeweils 0,5 mL Eluat in denselben Gläschen gesammelt. Außerdem wurde das Molekulargewicht des nativen Protein über Gelfiltration an Superose 12/HR[®] bestimmt. Wurde diese Gelfiltration in einem frühen Reinigungsschritt (als RS 2 / Abbildung 3.7-1) eingesetzt, wurde eine Anreicherung um den Faktor 6 mit einer Proteinausbeute von 18 % erreicht. Die Gesamtaktivität mit 93 % blieb dabei nahezu erhalten. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3.7-1 aufgeführt.

Ergebnisse

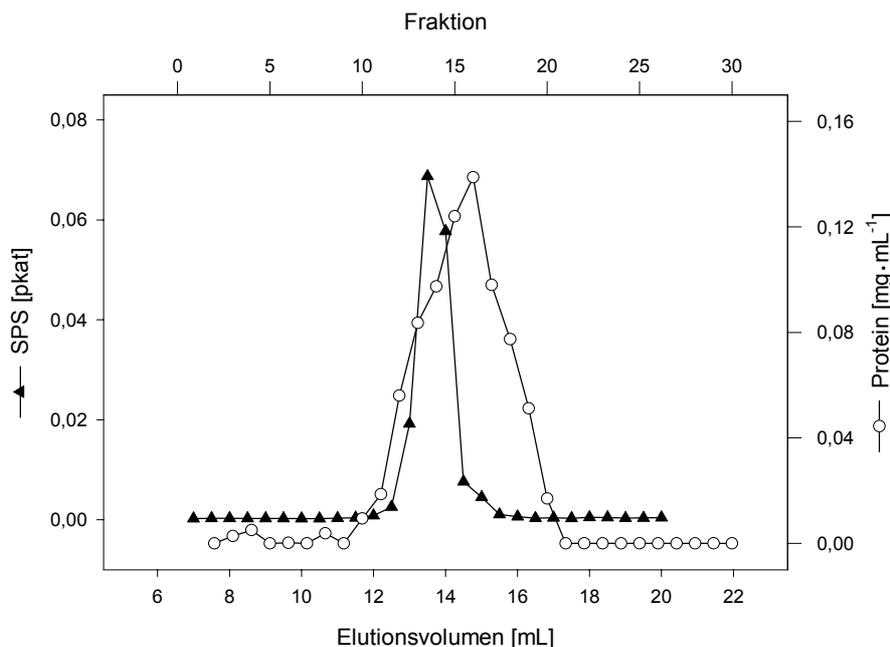


Abbildung 3.7-1: Verteilung der SPS-Aktivität in den Fraktionen der Gelpermeationschromatographie an Superose 12/HR®.

Die Reinheit der aktiven Fraktion nach einer Reinigungssequenz: fraktionierte Ammoniumsulfatfällung - Chromatographie an DEAE-Sephrose - Hydrophobe-Interaktionschromatographie an Alkylsephrose, wurde mittels SDS-Page festgestellt (siehe Abbildung 3.7-2). Die Ausbeute und der Anreicherungs- bzw. Reinigungsfaktor konnten nicht bestimmt werden, da die Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze bei der Proteinbestimmung nach BRADFORD (BRADFORD 1976) lag (Ergebnisse siehe Tabelle 3.7-1).

Tabelle 3.7-1: Anreicherungstabelle für die Reinigung der Styrylpyronsynthase an Superose 12 /HR. Zu jedem Schritt sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. AF: Anreicherungsfaktor; /: Enzymaktivität nicht nachweisbar, RS: Reinigungsstufe; 2: Ammoniumsulfatgefällte Proteinlösung, entsalzt über PD-10 nach 100000 x g Zentrifugation (1h) 4: Proteinfraction nach Chromatographie an DEAE-Sephrose (RS 3) und anschließender Chromatographie an Alkylsephrose, EV: Elutionsvolumen.

Proteinfraction	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS 2	1,23	0,04	1,5	4,290	AF: 6
Fraktion 15	7,40	0,07	1,0	0,360	Gesamtaktivität: 93 %
Fraktion 16	5,50	0,06	1,0	0,414	Ausbeute: 18 %
RS 4	14,13	0,00625	0,6	0,7	
Fraktion 32 (= 13 mL EV)	/	0,0068	0,5	/	Gesamtaktivität: 91 %

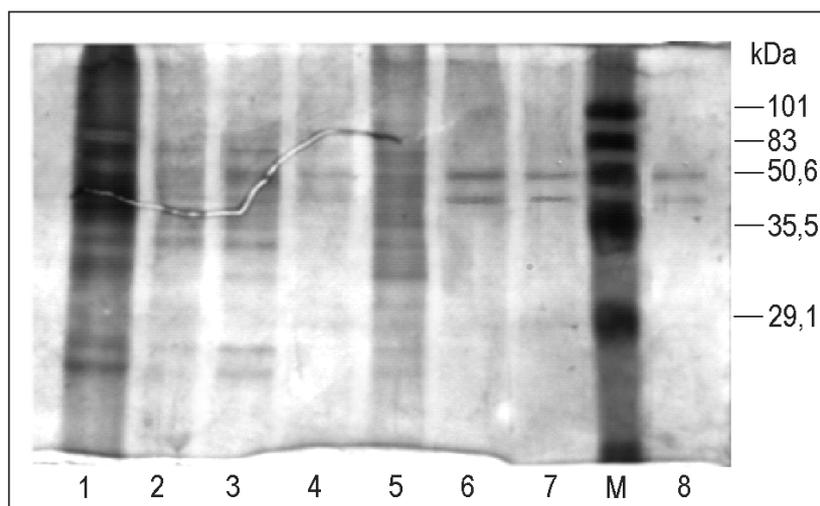


Abbildung 3.7-2: Gelelektrophoretische Kontrolle des Reinigungserfolgs der SPS nach den einzelnen Reinigungsschritten. SDS-PAGE der SPS Präparationen (Silberfärbung) Spur (1): 40-65 % Ammoniumsulfatfraktion, Spur (2): Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose FF, Spur (3): 1. HIC an Alkyl Superose (vereinigte Fraktionen), Spur (4): HIC an Alkyl Superose (vereinigte Fraktionen), Spur (5): Gelfiltration an Superose 12HR® (RS 2), Spur (6) und (7): Gelfiltration an Superose 12HR® nach HIC-Alkyl Superose, (M) Molekulargewichtsmarker, Spur (8): Probenpuffer.

Gelfiltration an Sephacryl S-200

Die Gelfiltration an Sephacryl S-200 diente zur Bestätigung der Molekulargewichtsbestimmung, die mit der Gelfiltration an Superose 12/HR durchgeführt wurde. Die SPS eluierte in einem Peak mit einem Maximum der Enzymaktivität bei einem Elutionsvolumen von 51-54 mL (siehe Abbildung 3.7-3). Injiziert wurde 1 mL Proteinlösung, gesammelt wurden Fraktionen mit 0,5 mL Eluat bei einem Durchfluss von $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Diese Säule eignete sich nicht zur Proteintrennung. Hohe Aktivitätsverluste während der um eineinhalb Stunden verlängerten Trennung, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, konnten auch nicht durch Vorlage von Stabilisatoren (Glycerin und Natriumascorbat) in die Sammelgläschen vermieden werden. Geringe Ausbeuten, die bei diesem Chromatographieschritt erzielt wurden, schlossen diese Trennmethode als frühen Bestandteil einer Reinigungssequenz zusätzlich aus (siehe Tabelle 3.7-2). Zudem zeigte die Reinheitskontrolle über SDS-PAGE bei einer Reinigungssequenz, in der die Gelfiltration an Sephacryl S-200 zu einem späteren Schritt eingesetzt wurde, immer noch das Vorhandensein verschiedener Proteinbanden bei der gelelektrophoretischen Kontrolle des Reinigungserfolgs der SPS (durchgeführte SDS-Page ohne Abbildung).

Ergebnisse

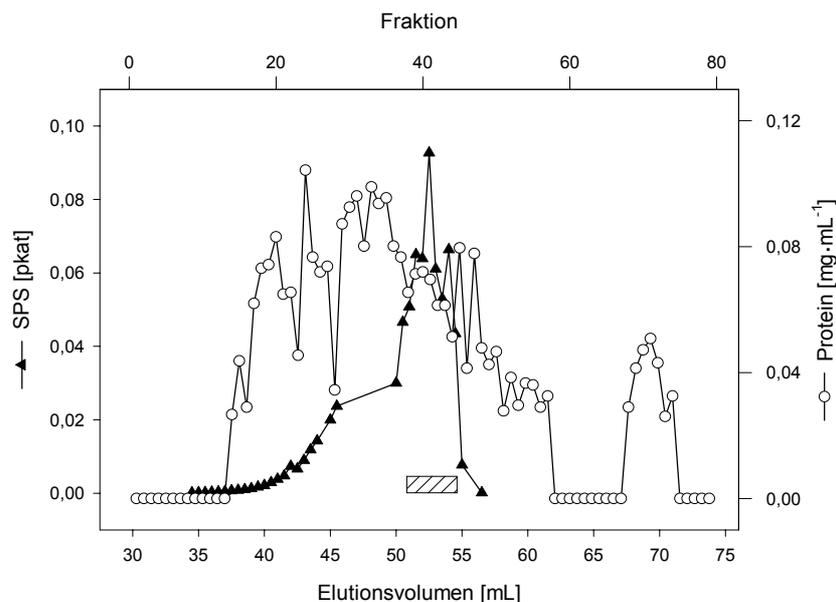


Abbildung 3.7-3: Verteilung der SPS-Aktivität in den Fraktionen der Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S-200 mit Proteinfraction RS2.
 : vereinigte Fraktionen des Eluates (Fraktion 35-41).

Tabelle 3.7-2: Anreicherungstabelle für Reinigung der Styrylpyronsynthase an Sephacryl S-200. Zu jedem Schritt sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. AF: Anreicherungsfaktor; /: nicht nachweisbar RS: Reinigungsstufe; 2: Ammoniumsulfatgefällter Rohextrakt, entsalzt über PD-10 und anschließende Zentrifugation bei 100000 x g, 4: Proteinfraction nach Chromatographie an DEAE-Sephacryl und anschließender Chromatographie an RESOURCE Isopropyl (RS3).

Proteinfraction	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS 2	0,53	0,0582	1	1,5	AF: keiner Gesamtaktivität: 1,3% Ausbeute: 18 %
Eluat (= Fraktion 35-41)	0,21	0,0043	2	0,27	
RS 2	0,024	0,0002	1500	260	Gesamtaktivität: 0,1%
RS 4	0,49	0,0054	0,2	0,035	
Eluat (= Fraktion 32)	/	0,0013	0,5	/	

3.7.1.2 Chromatographie an Hydroxylapatit

Kristallines Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) findet dann Einsatz in der Proteinreinigung, wenn mit alternativen Trennmethode n wie Ionenaustauschchromatographie oder Hydrophobe-Interaktionschromatographie keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden (HARRIS 1989). Der Absorptionsmechanismus des Hydroxylapatit (HA) ist bis jetzt nicht in allen Einzelheiten geklärt. Amino- und Carboxyl-Gruppen der Proteine binden unterschiedlich an Hydroxylapatit. Basische Proteine binden über Aminogruppen an die negative Oberflächenladung des Minerals. Saure Proteine bilden über ihre Carboxylgruppen Komplexbindungen mit dem Calcium-Anteil des Minerals (WILSON 1994) (GORBUNOFF 1985). Die relative Bindungskapazität beruht nicht auf einzelnen physikalischen Eigenschaften wie z.B. Molekulargewicht oder der Ladungsverteilung am Proteinmolekül, sondern ist eher als eine Funktion der Oberflächenladungsdichte anzusehen und ist abhängig vom Verhältnis Ladung zu Masse der Proteine. Es scheint ein Trend zu bestehen, dass sich Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt trennen, wobei saure Proteine keine Bindung eingehen oder sehr früh eluieren, neutrale und basische Proteine jedoch wegen der stärkeren Bindung entsprechend später (CUMMINGS 1994).

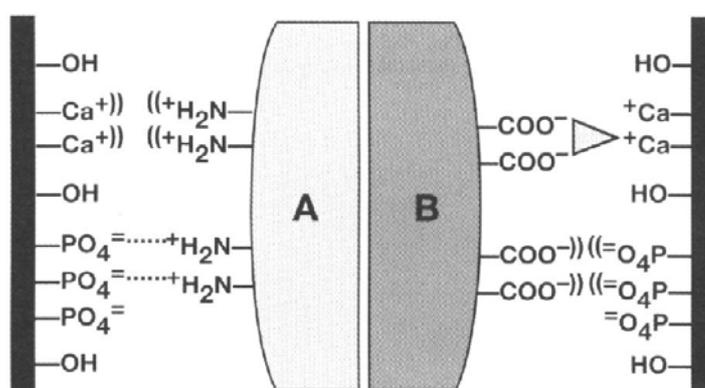


Abbildung 3.7-4: Vorstellung der Proteinbindung an Hydroxylapatit. A: Basisches Protein, B: Saures Protein; ((= Abstoßungskräfte, = Ionische Bindung, ► = Wechselwirkungen aufgrund gegenseitiger Ladung; nach BIORAD. US/EG Bulletin 2156.

Basische Proteine werden nach der Elutionsreihe F^- , Cl^- , ClO_4^- , SCN^- oder durch spezifischen Austausch der Phosphatgruppen durch Ca^{2+} oder Mg^{2+} getrennt. Saure Proteine werden durch Austausch der Carboxylgruppen durch Ionen, die stärkere Komplexe mit Calcium ausbilden können, von der Matrix eluiert. Fluorid oder Phosphat sind dazu beispielsweise geeignet.

Für die Reinigung der SPS wurden verschiedene kommerziell erhältliche Materialien neben selbst hergestelltem Hydroxylapatit getestet. Nach den schwachen Ergebnissen mit kommerziell erworbenen Hydroxylapatitchargen wurde nach persönlicher Rücksprache mit Herrn Dr. Werner Heller eine eigene Herstellung von Hydroxylapatit in Erwägung gezogen, um damit eventuell eine verbesserte Trennung zu erreichen. Die Reinigung der

Ergebnisse

Chalconsynthese aus Petersilienzellkulturen wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Heller (GSF München) mit Hilfe von selbsthergestelltem Hydroxylapatit, welches wesentlich bessere Trenneigenschaften als käufliches aufwies, während eines Reinigungsschritts innerhalb einer Reinigungssequenz erreicht (KREUZALER und HAHLBROCK 1975A).

Die SPS konnte nur teilweise an das HA-Material der Firma CALBIOCHEM gebunden werden (siehe Abbildung 3.7-5). Nachdem ungebundenes Protein mit 10 mM K-Pi Puffer (pH 6,8) von der Säule vollständig eluierte, wurde mit einem stufenlosen Gradienten innerhalb 30 min bei einem Durchfluss von $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ die Molarität auf 300 mM K-P_i erhöht. Das Sammelvolumen pro Fraktion betrug jeweils 1 mL. SPS-Aktivität wurde sowohl im Durchlauf als auch im Eluat detektiert, im Durchlauf betrug die Gesamtaktivität 23 % mit einer Anreicherung um den Faktor 2,2. Im Eluat wurde eine Anreicherung um den Faktor 3,3 erreicht mit einer Gesamtaktivität von 2,7 % und einer Ausbeute von 1,5 %.

In Tabelle 3.7-3 sind die Enzymdaten zur Chromatographie an Hydroxylapatit (CALBIOCHEM) aufgeführt.

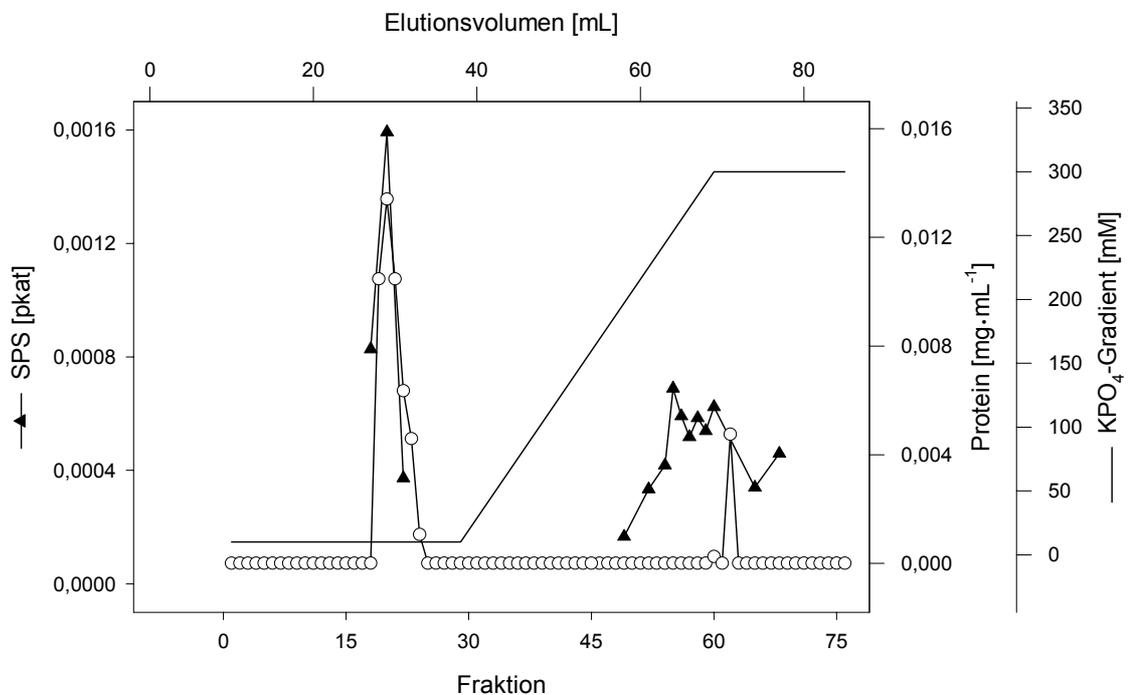


Abbildung 3.7-5: Verteilung der SPS-Aktivität nach Chromatographie an Hydroxylapatit (CALBIOCHEM).

Ergebnisse

Tabelle 3.7-3: Anreicherungstabelle für Reinigung der Styrylpyronsynthase an Hydroxylapatit (CALBIOCHEM). Zu jedem Schritt sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. AF: Anreicherungsfaktor; RS: Reinigungsstufe, 2: Ammoniumsulfatgefällter Rohextrakt, entsalzt über PD-10.

Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS 2	0,18	0,0082	1	1,8	
Durchlauf	0,4	0,0027	7	0,73	AF: 2,2 Gesamtaktivität: 23 % Ausbeute: 40 %
Eluat	0,6	0,00038	6	0,027	AF: 3,3 Gesamtaktivität: 2,7 % Ausbeute: 1,5 %

An Materialien der Firma Biorad blieb ebenfalls die Hauptproteinmenge der aufgetragenen Fraktion ungebunden. Die SPS eluierte im Durchlauf mit einer Anreicherung um den Faktor 2,2 mit 40 % Gesamtaktivität und einer Proteinausbeute von 40 %. Bei einem Bindungstest der SPS an selbst hergestelltem Material wurde festgestellt, dass die SPS nicht gebunden hatte; sie eluierte im Durchlauf mit einer Anreicherung um den Faktor 23, einer Gesamtaktivität von 46 % mit einer 2 %igen Proteinausbeute.

3.7.1.3 Hydrophobe-Interaktionschromatographie (HIC)

Die Trennung bei der HIC beruht auf der unterschiedlichen Assoziation von hydrophoben Oberflächenbereichen von Proteinen mit den hydrophoben Oberflächen der HIC-Materialien. Die Assoziationsneigung hängt von den Eigenschaften der wässrigen Phase und den darin gelösten Salzen ab. Hohe Konzentrationen von bestimmten Salzen verstärken die hydrophoben Wechselwirkungen. Unpolare Oberflächenregionen eines Proteins interagieren mit hydrophoben Liganden der stationären Phase. Proteine werden deshalb bei hoher Salzkonzentration an die hydrophoben Liganden adsorbiert und durch Erniedrigung der Salzkonzentration und/oder Zugabe von Agenzien, die der hydrophoben Interaktion entgegenwirken, eluiert. Je hydrophober der Ligand des Materials ist, desto stärker werden die Proteine zurückgehalten. Hier kann es zu Schwierigkeiten bei der Elution der Proteine in nativem Zustand kommen. Ist der Ligand zu hydrophil, sind eventuell zu hohe Salzkonzentrationen nötig um das Protein zu binden. Mögliche Probleme zeigen sich wenn die Proteine mit breitem Peak eluieren. Dies ist meist mit einer partiellen Denaturierung und einer geringen Wiederfindung für weniger hydrophobe Proteine verbunden (HJERTEN 1981, KATO 1987). Für die Reinigung der SPS mit Hilfe der HIC wurden verschiedenen Liganden nach Herstellerempfehlungen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7-4 aufgeführt. Sowohl Octyl- als auch Phenyl-Liganden konnten die SPS binden, diese Materialien führten aber zu keiner Reinigung. Die SPS eluierte zum Teil in breiten Peaks, was auf eine partielle

Ergebnisse

Denaturierung des Proteins hinweist, die sich auch in der verminderten Aktivität widerspiegelte. Butylsepharose mit schwächer hydrophoben Eigenschaften wurde ebenfalls getestet. Die Startbedingungen (siehe Abschnitt 2.9.7) wurden wie bei den Octyl- / Phenylsepharose Liganden gewählt. Die SPS band auch hier vollständig an das Chromatographiematerial. Das Elutionsverhalten bei optimierter Gradientenelution ist innerhalb der Reinigungssequenz in Abschnitt 3.7.2.4 beschrieben und abgebildet. Die Anreicherung war bei den Testversuchen 5-fach, die Gesamtaktivität der eingesetzten Proteinlösung blieb erhalten und es wurde eine Ausbeute von 41 % erzielt.

Tabelle 3.7-4: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS an verschiedenen HIC Materialien. Zu jedem Material sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. AF: Anreicherungsfaktor; /: nicht nachweisbar RS: Reinigungsstufe, 2: Ammoniumsulfatgefällter Rohextrakt, entsalzt über PD-10.

Material: HIC Phenyl Sepharose High Performance

Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS 2	2,2	0,03	1	0,23	AF: /
Eluat	0,54	0,0011	6	0,22	Gesamtaktivität: 44 % Ausbeute: 95 %

Material: HIC Phenyl Sepharose Low Substitued

RS 2	2,2	0,03	1	0,23	AF: /
Eluat	1,81	0,002	3,5	0,12	Gesamtaktivität: 23 % Ausbeute: 52 %

Material: HIC Phenyl Sepharose High Substitued

RS 2	1,1	0,02	1	0,4	AF: /
Eluat	0,17	0,0008	4,5	0,12	Gesamtaktivität: 18 % Ausbeute: 30 %

Material: HIC Butyl Sepharose

RS 2	0,445	0,015	2	1,41	AF: 5
Eluat	2,26	0,010	3	0,578	Gesamtaktivität: 100 % Ausbeute: 41 %

Material: HIC Octyl Sepharose

RS 2	0,375	0,015	2	1,51	AF: /
Eluat	0,16	0,00041	9	0,615	Gesamtaktivität: 12 % Ausbeute: 41 %

Für die weitere Reinigung von Proteinextrakten, die schon mehrere Reinigungsstufen durchlaufen hatten, wurden HIC Materialien mit kleinerer Korngröße getestet, wie zum Beispiel Alkylsepharose, ein Material das nur mittels FPLC betrieben werden kann. Für

Ergebnisse

diesen Reinigungsschritt wurde mit Fraktionen verwendet, die nach Ionenaustausch-Chromatographie erhalten wurden (siehe Abbildung 3.7-6 und Tabelle 3.7-5). In einem absteigenden Ammoniumsulfat-Gradienten (2-0 M) innerhalb von 15 mL wurden Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 mL gesammelt. Sämtliche Fraktionen wurden sowohl mit *p*-Cumaroyl als auch Kaffeoyl-CoA als Substrat getestet. Es zeigte sich, dass sowohl nach 20 mL als auch nach 24 mL eine SPS Aktivität zu detektieren war, wenn im anschließenden Enzymtest *p*-Cumaroyl-CoA als Substrat eingesetzt wurde. Dies ist deutlich an Hand der zwei scharfen Peaks im Chromatogramm zu erkennen. Die aktiven Fraktionen wurden hierauf in zwei getrennten Fraktionen vereinigt. Für den Test der Fraktionen mit Kaffeoyl-CoA ergab sich die Elution der SPS in der Hauptfraktion. Mit der Chromatographie an Alkylsepharose wurde ein hoher Anreicherungsfaktor von 50 bzw. 63 erreicht mit einer Ausbeute von 9,7 % (siehe Tabelle 3.7-5).

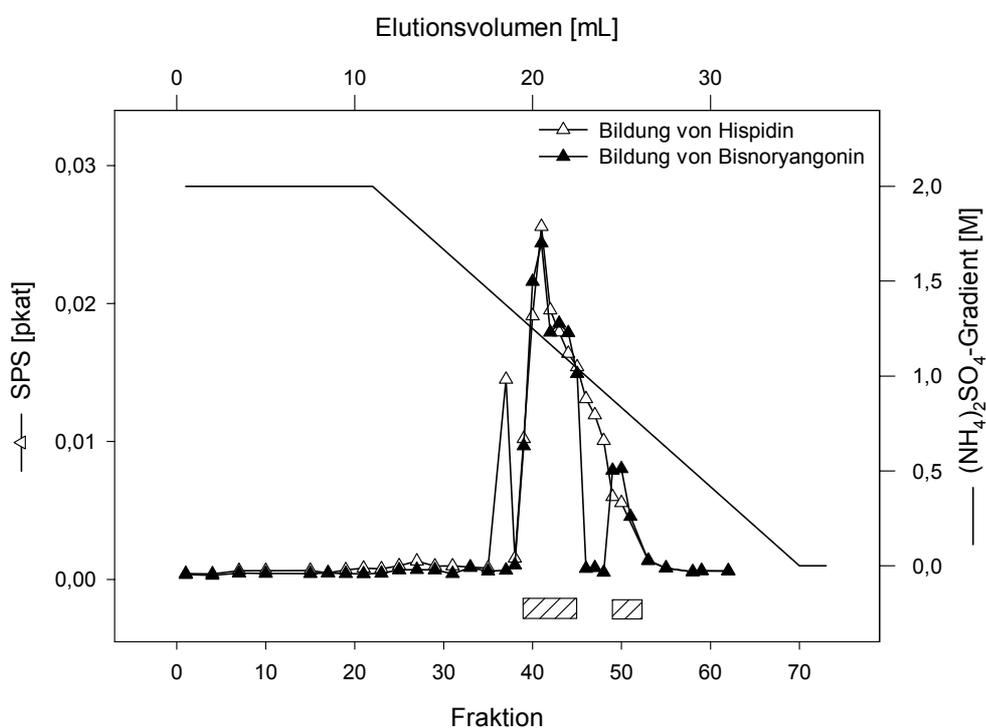


Abbildung 3.7-6: Verteilung der SPS-Aktivität in den Fraktionen der Chromatographie an Alkylsepharose.  vereinigte Fraktionen: Fraktion 39-45 und Fraktionen 49-52.

Ergebnisse

Tabelle 3.7-5: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS an Alkylsepharose. Bei jedem Schritt sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. AF: Anreicherungsfaktor; RS: Reinigungsstufe, 3: Proteinfraction nach Chromatographie an DEAE-Sepharose. * Test der SPS-Aktivität mit Kaffeoyl-CoA.

Material: Alkylsepharose

Proteinfraction	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS 3	0,252 / 0,248*	0,0074 / 0,0073*	9	5,24	AF: F1:50 / 75* F 2: 63 / 16*
Fraktion 39-45 (F1)	12,47 18,57*	0,0062 0,0096*	3,5	0,350	Gesamtaktivität: F 1: 32,5 % / 51 %*
Fraktion 49-52 (F2)	15,79 4,2*	0,0063 0,0008*	2	0,160	F 2: 18,6 % / 2 %* Ausbeute: 9,7 %

Für das High-Load-System standen ebenfalls einige HIC Materialien zur Verfügung, die für eine Endreinigung von Proteinen geeignet sind. Laut Hersteller Auskunft müssen auch hier die Materialien getestet werden, da eine Übertragung der Ergebnisse von anderen HIC Materialien mit anderer Matrix nicht möglich ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7-6 aufgeführt.

Die Resultate zeigen, dass eine Optimierung der Isopropyl-Säule auf Bindung und Elution sinnvoll war. In den Vorversuchen wurde eine teilweise Bindung der SPS-Aktivität an das Material festgestellt, verbunden mit einer Anreicherung (AF 1,6 bei der Durchlauf-Fraktion und 1,4 bei der Eluat-Fraktion). Die Ergebnisse dieser Optimierung und eine Abbildung des Elutionsprofils sind in der Beschreibung der Reinigungssequenz aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 3.7-6: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS an HIC RESOURCE Materialien. Zu jedem Test sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. AF: Anreicherungsfaktor, RS: Reinigungsstufe, 3: Proteinfraktion nach Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose.

Material: RESOURCE Ethyl

Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS 3	0,4168	0,0138	1	1,1	AF: 1,05
Durchlauf	0,43	0,0046	3	0,261	Gesamtaktivität: 100 % Ausbeute: 24 %

Material: RESOURCE Phenyl

Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS 3	0,4168	0,0138	0,5	0,551	AF: /
Durchlauf	0,3161	0,00027	1	0,014	Gesamtaktivität: 3,9 % Ausbeute: 2,5 %

Material: RESOURCE Isopropyl

Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS 3	0,4168	0,0138	1	1,1	AF: 1,6 / 1,4
Durchlauf	0,687	0,0047	2	0,52	Gesamtaktivität: Durchlauf: 68 % Eluat: 11,3 %
Eluat	0,5798	0,00078	2	0,50	Ausbeute: Durchlauf: 47 % Eluat: 4,5 %

3.7.1.4 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen von Proteinen an einer positiv oder negativ geladenen Matrix. Man spricht daher von Anionen- und Kationen-Austauschern. Für die Reinigung der SPS wurden neben dem schwachen Ionenaustauscher DEAE-Sepharose noch zwei stärker bindende Materialien (HiTrap Q und Source Q15) getestet. Source Q15 Material hatte gegenüber der DEAE-Sepharose den Vorteil, dass zur Bindung der SPS der pH-Wert auf pH 6,8 gesenkt werden konnte und somit die Stabilität der SPS in Lösung besser gewährleistet war (siehe Abschnitt 3.6.1). Die Ergebnisse der getesteten Ionenaustauschmaterialien sind in Tabelle 3.7-7 dargestellt. Es zeigte sich, dass die DEAE-Sepharose für den ersten Schritt der säulen-

Ergebnisse

chromatographischen Trennung am besten geeignet schien, weil hier die größte Ausbeute erzielt werden konnte. Das Elutionsverhalten der SPS an der DEAE-Sepharose ist innerhalb der Reinigungssequenz (siehe Abschnitt 3.7.2) genau beschrieben. Da der optimale pH-Wert für die Bindung der SPS an DEAE-Sepharose bei pH 8,3 lag, wurde ebenfalls ein Kationenaustauscher (HiTrap SP) getestet. Es wurden aber weder eine Bindung noch ein Reinigungsfaktor erreicht (siehe Tabelle 3.7-7).

Tabelle 3.7-7: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS an Ionenaustausch-Materialien. Zu jedem Test sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. AF: Anreicherungsfaktor; RS: Reinigungsstufe2: Ammoniumsulfatgefällte Proteinlösung, entsalzt und umgepuffert über PD-10.

Material: DEAE-Sepharose					
Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS2	0,03	0,089	4,5	29,2	AF: 18
Eluat	0,53	0,009	34	24,5	Gesamtaktivität: 76 % Ausbeute: 84 %
Material: HiTrap Q					
Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS2	0,022	0,00275	2	0,5	AF: 1,6
Eluat	0,33	0,000464	6	0,18	Gesamtaktivität: 51 % Ausbeute: 36 %
Material: Source Q 15					
Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS2	0,01	0,000488	4,5	6,27	AF: 5
Durchlauf	0,05	0,000103	34	0,24	Gesamtaktivität: 23 % Ausbeute: 3,8 %
Material: HiTrap SP					
Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS2	0,55	0,0049	2	0,36	AF: 1,5
Durchlauf	0,85	0,0056	6	0,12	Gesamtaktivität: 70 % Ausbeute: 33 %

3.7.2 Reinigungssequenz für die Styrylpyronsynthese

3.7.2.1 Zellernte und Aufschluss zur Rohextraktgewinnung (Reinigungsstufe 1)

Für die Reinigung der SPS wurden 600 g frisches Gametophytenmaterial in annähernd 100 g Portionen homogenisiert. Nach Entfernung der festen Bestandteile durch Filtration und Zentrifugation mit anschließendem Zentrifugationsschritt bei $100000 \times g$ hatten diese Rohextraktfraktionen im Mittel eine spezifische SPS-Aktivität von $0,09 \pm 0,02 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein ($n = 6; \pm s$).

3.7.2.2 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (Reinigungsstufe 2)

In einem ersten Reinigungsschritt wurde der Rohextrakt weiterhin in getrennten Portionen der oben erhaltenen Rohextraktionsfraktionen einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Die SPS-Aktivität präzipitierte vollständig zwischen 35 % und 65 %. Die resultierenden Proteinniederschläge wurden mit wenig Puffer RP 2 homogenisiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. In diesem Schritt wurde die SPS durch Entfernung niedermolekularer Verbindungen und eines Teils der Proteine bei einer Proteinausbeute von 63 % um das 1,7-fache gereinigt. Die spezifische Aktivität betrug im Mittel $0,16 \pm 0,04 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein.

3.7.2.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose FF (Reinigungsstufe 3)

Die Ionenaustauschchromatographie bot sich als erster säulenchromatographischen Reinigungsschritt an, da sich die gefällten Ammoniumsulfatproteinniederschläge mit Hilfe von Dialyse sehr gut gelöst hatten und in den Proteinproben die Gesamtaktivität erhalten blieb. Eine bis zu 5-fache Anreicherung gegenüber dem Rohextrakt wurde hier erreicht. Die spezifische Aktivität der vereinigten Fraktionen aus 3.7.2.2 betrug $0,41 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein. Die Proteinfraktion wurde kurz vor dem Auftragen mit KOH auf pH 8,3 titriert. Die Chromatographie wurde in zwei Läufen durchgeführt. Ein repräsentativer Lauf ist in Abbildung 3.7-7 dargestellt. Das Elutionsprofil zeigte 3 Hauptpeaks. Die SPS band vollständig an das Material, eluierte bereits bei einer sehr niedrigen Salzkonzentration (etwa 0,2 M NaCl) und konnte sich durch die optimierte Gradientenelution (in $3\frac{1}{2}$ Säulenvolumina wurde eine 0,6 M NaCl-Konzentration eingestellt) gut von der Hauptproteinmenge abtrennen lassen.

Ergebnisse

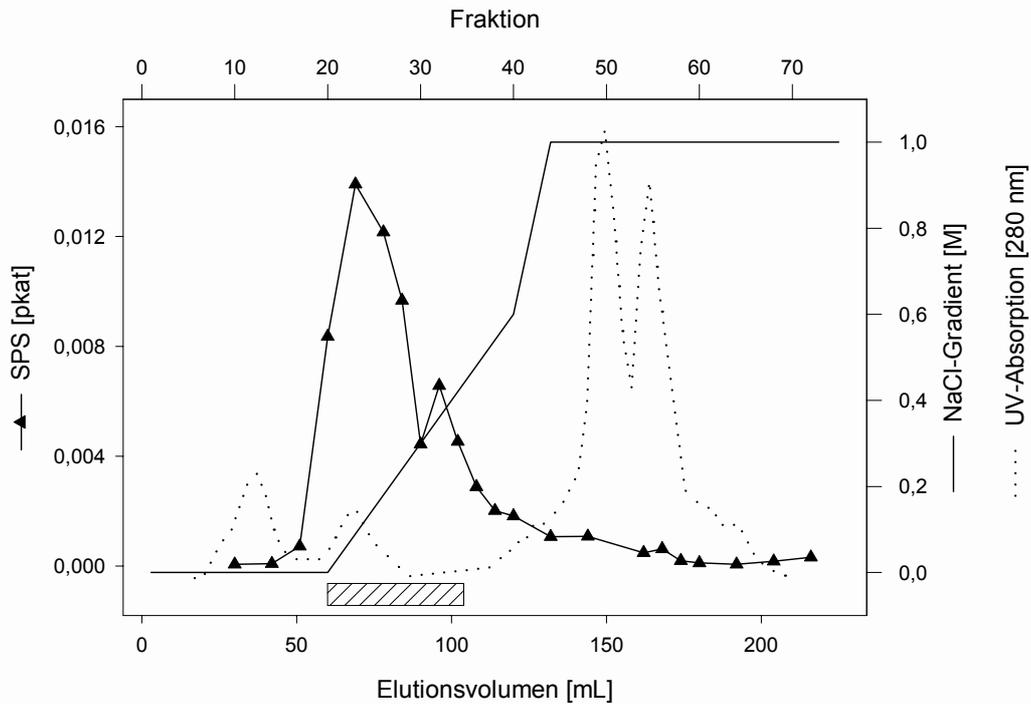


Abbildung 3.7-7: Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose FF (Reinigungsstufe 3). Die Proteinelution wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt.

Um die Aktivität der SPS möglichst gut zu konservieren, wurde eine konzentrierte Natriumascorbatlösung (Endkonzentration 20 mM) und Glycerin (10 %) in den Sammelgläschen vorgelegt. Das Sammelvolumen betrug 3 mL. Damit wurde erreicht, dass sich das Protein bis zur weiteren Verwendung in einem Medium mit neutralem pH-Wert befand. In Abschnitt 3.6.1 sieht man, dass die SPS-Aktivität durch die Zugabe von Natriumascorbat und Glycerin bei neutralem pH-Wert über einen längeren Zeitraum erhalten blieb. Die spezifische Aktivität der SPS in den vereinigten Fraktionen betrug nach diesem Schritt $2,04 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$. Damit ergab sich eine 5-fache Anreicherung gegenüber der dialysierten Proteinlösung bei einer Proteinausbeute von 67 %. Die Gesamtaktivität betrug nach diesem Schritt noch 85 % gegenüber dem Rohextrakt. Die Proteinausbeute und auch der Anreicherungsfaktor waren allerdings insgesamt niedriger als in den Vorversuchen. Bei diesen Versuchen konnte eine bis zu 12-fache Anreicherung erreicht werden.

3.7.2.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butylsepharose (Reinigungsstufe 4)

Die HIC als Anschlusschritt an die Ionenaustauschchromatographie schien sinnvoll, da als Endreinigungsschritt ebenfalls eine Hydrophobe Interaktionschromatographie durchgeführt wurde, so dass eine Umpufferung durch Verwendung des gleichen Puffers und ohne Proteinkonzentrierungsschritte die Säulenchromatographie direkt im Anschluss erfolgen konnte. Aufgrund des Vergleichs verschiedener Sepharose Materialien kam Butylsepharose in Frage, da hier eine hohe Ausbeute mit einem deutlichen Anreicherungsfaktor verknüpft war (siehe Abschnitt 3.7.1.3). Mit 1 M Ammoniumsulfat in 0,05 M K-P_i Puffer (RP 4), bei einer Flussrate von 0,6 mL·min⁻¹ beim Auftragen der Proteinlösung wurde erreicht, dass die gesamte SPS-Aktivität an das Material gebunden hatte. Die Enzymaktivität eluierte im absteigenden Ammoniumsulfat-Gradienten bei etwa 0,15 M Ammoniumsulfat. Eine bessere Abtrennung von restlichen Proteinfraktion wurde durch die Optimierung des Gradienten erreicht. Nach der Elution von ungebundenem Protein wurde eine Stufe mit einer Elutionspufferkonzentration von 0,55 M (NH₄)₂SO₄ eingeführt (siehe Gradientenlinie in Abbildung 3.7-8). Die Fraktionen zeigten eine 6-fache Anreicherung bei einer Gesamtaktivität von 30 % mit 1,99 pkat·mg⁻¹ Protein. Die Aktivität der vereinigten Fraktionen dagegen konnte bis zur Weiterverarbeitung trotz Stabilisatoren nicht auf diesem Niveau gehalten werden. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 3.7-8 dargestellt.

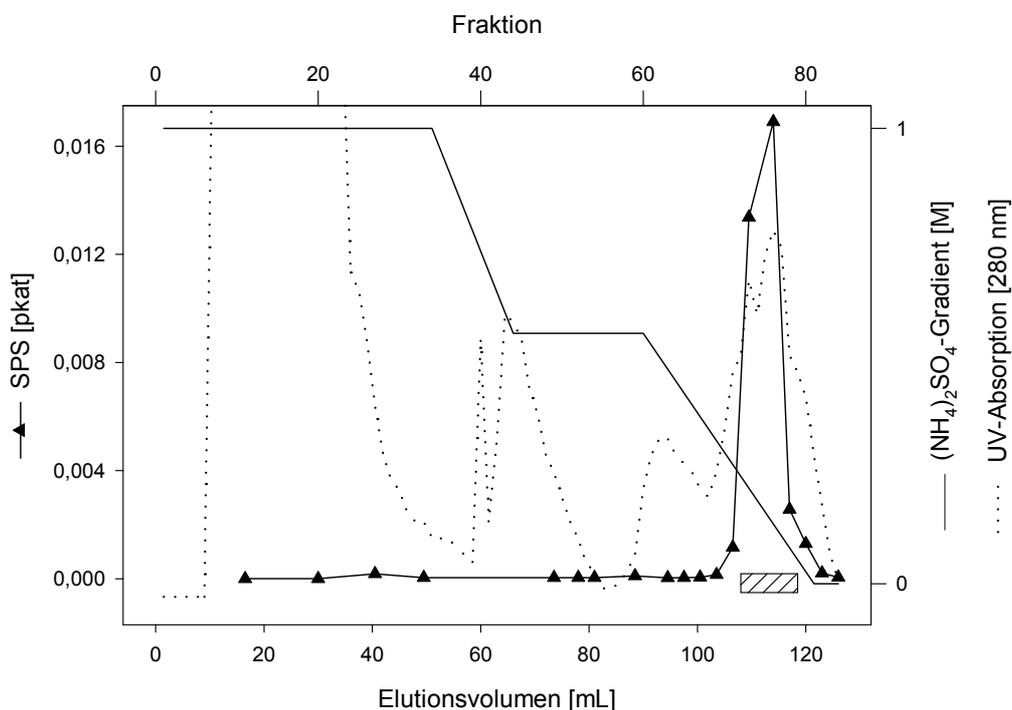


Abbildung 3.7-8: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butylsepharose Die Proteinelution wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt.

3.7.2.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie an RESOURCE Isopropyl (Reinigungsstufe 5)

Vorversuche zeigten eine hohe Anreicherung der SPS nach zweimaliger Chromatographie an diesem Material. Nach dieser Reinigungssequenz wurde eine spezifische Aktivität von $165 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein gemessen, dies entsprach einer Anreicherung um den Faktor 673 (siehe Tabelle 3.7-8). Deswegen wurde dieser Schritt an den Schluss der Reinigungssequenz gesetzt.

Tabelle 3.7-8: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS mit wiederholter Chromatographie an HIC RESOURCE Isopropyl. Zu jedem Test sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. AF: Anreicherungsfaktor; RS: Reinigungsstufe
1: Rohextrakt, 2: Ammoniumsulfatgefällte Proteinlösung, entsalzt über PD-10,
3: Chromatographie an DEAE-Sepharose, 4: Proteinfraktion nach Chromatographie an HIC RESOURCE Isopropyl 5: Wiederholung des 4. Schrittes.

Proteinfraktion	SPS-Aktivität		Volumen [mL]	Protein [mg]	
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]			
RS1	0,0245	0,0002	1200	300	AF: 673
RS 4	2,2	0,019	3	0,537	Gesamtaktivität: 0,2 %
RS 5	165	0,0031	0,5	0,0075	Ausbeute: 0,005 %

Optimiert wurde dieser Schritt wiederum durch die Einstellung eines sehr langsamen Durchflusses von $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ bei der Auftragung der Proteinlösung. So konnte eine vollständige Bindung der SPS an dieses Material erreicht werden. Durch Einfügen einer Stufe im Gradienten bei 0,9 M Ammoniumsulfatkonzentration des Elutionspuffers wurde die SPS besser von der restlichen Proteinfraktion abgetrennt. Das Protein wurde in Fraktionen gesammelt und insgesamt 4,4-fach angereichert, bei einer Proteinausbeute von 0,08 % und einer Gesamtaktivität von 2 %. Abbildung 3.7-9 zeigt das Elutionsprofil dieses Chromatographieschrittes.

Ergebnisse

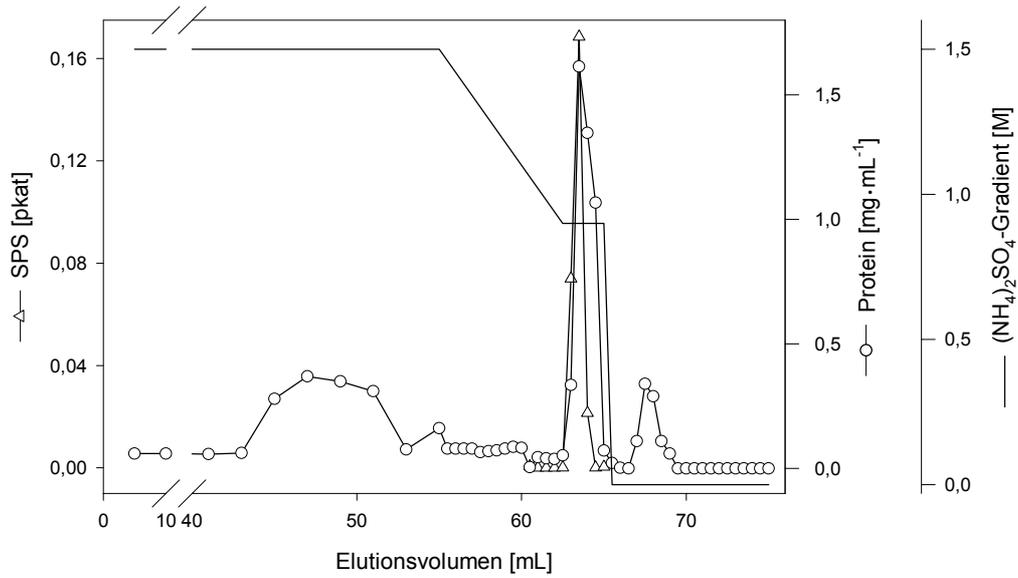


Abbildung 3.7-9: Hydrophobe Interaktionschromatographie an RESOURCE Isopropyl. Es wurden 0,5 mL Fraktionen gesammelt, deren Proteingehalt bestimmt und auf SPS-Aktivität getestet.

Eine Wiederholung dieses Schrittes mit einem Teil der Proteinfraction brachte im Gegensatz zu Vorversuchen keine weitere Reinigung. Das native Enzym war äußerst labil, nach diesem Schritt konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Ergebnisse

3.7.2.6 Zusammenfassung der Reinigung der säulenchromatographischen Schritte

Die Reinigung der SPS bis zur Homogenität erwies sich als außerordentlich schwierig, da keine der getesteten Möglichkeiten einen herausragenden Reinigungseffekt zeigte. In Tabelle 3.7-9 sind die Reinigungsschritte zusammengestellt. In einer sechs Schritten umfassenden Reinigung wurde die SPS mit einer Ausbeute von 0,08 % gereinigt und 1107-fach angereichert. Die spezifische Aktivität der resultierenden Enzympräparation betrug $4,4 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein.

Nach jedem Reinigungsschritt wurden Aliquots aus dem SPS-Aktivitätspool entnommen und von allen Proben eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Abbildung 3.7-10 zeigt die erhaltene SDS-PAGE.

Tabelle 3.7-9: Anreicherungstabelle für die Reinigung der Styrylpyronsynthase-Aktivität aus *Equisetum arvense* L. Gametophyten Sterilkulturen. Zu jedem Schritt sind die dazugehörigen Enzymdaten aufgeführt. Als Gesamtpool werden die Fraktionen bezeichnet, die nach einem Reinigungsschritt erhalten wurden der in mehreren Läufen durchgeführt wurde (Stufe 3) bzw. der bis zum nächsten Chromatographieschritt bei -80°C gelagert wurde (Stufe 4).

Reinigungsstufe	SPS-Aktivität		Gesamtaktivität [%]	Protein [mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungsfaktor
	[pkat·mg ⁻¹]	[pkat]				
Stufe 1	0,09	0,0023	100	122		
Stufe 2	0,41	0,03	55	21	17	4,5
Stufe 3	2,04	0,03				5
Gesamtpool	0,35	0,01	29	15	12	
Stufe 4	1,99	0,01				6
Gesamtpool	0,31	0,0025	7	4,4	3,6	
Stufe 5	4,4	0,0013	2	0,1	0,08	14

Stufe 1: Rohextrakt nach 100000 x g Zentrifugation

Stufe 2: Ammoniumsulfat-Fraktionierung 35-65 % mit anschließender Dialyse

Stufe 3: Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF

Stufe 4: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butyl-Sepharose

Stufe 5: Hydrophobe Interaktionschromatographie an HIC-RESOURCE Isopropyl

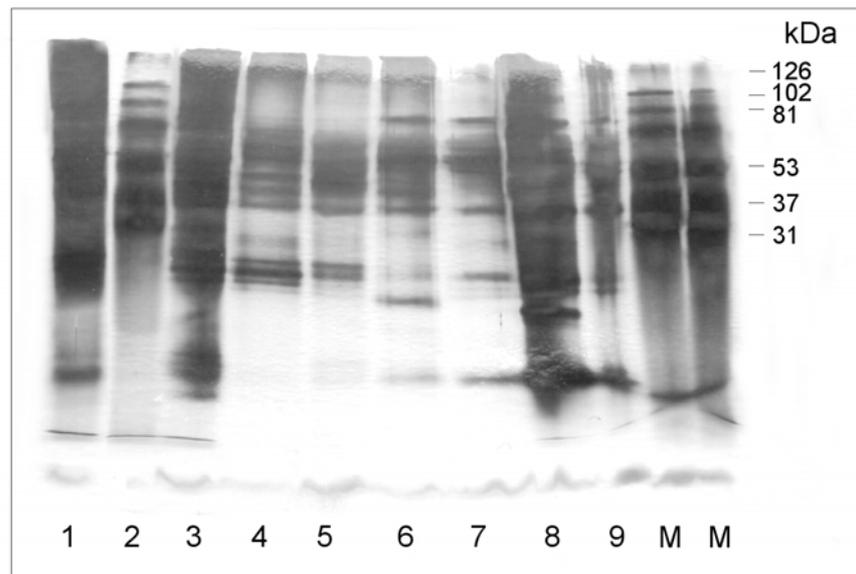


Abbildung 3.7-10: SDS-PAGE der SPS-Präparation nach den einzelnen Reinigungsstufen (Silberfärbung).

- (1) Rohextrakt,
- (2) Molekulargewichtsmarker
- (3) Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE Sepharose FF[®]
- (4) HIC an Butylsepharose, Fraktion 78,
- (5) HIC an Butylsepharose Gesamtpool
- (6) HIC an RESOURCE Iso[®] Gesamtpool
- (7) (8) (9) HIC an RESOURCE Iso[®] Präparation der aktiven Fraktion in unterschiedlichen Konzentrationen,
- (M) Molekulargewichtsmarker.

3.8 β -Glykosyltransferase

3.8.1 Enzymaktivitäten in Gametophyten

Equisetumpyron ist in axenisch kultivierten Gametophyten in Konzentrationen von 1-9 mg·g⁻¹ Trockengewicht (VEIT *et al.* 1993B) enthalten. Prothallien lassen sich problemlos unter sterilen Bedingungen kultivieren und über Subkulturen vermehren (siehe Abschnitt 2.3). Für biochemische Untersuchungen stand somit auch für die Untersuchung einer Glycosyltransferase als Endschritt der Equisetumpyronsynthese sich genetisch entsprechendes Material zur Verfügung (siehe Abbildung 3.8-1).

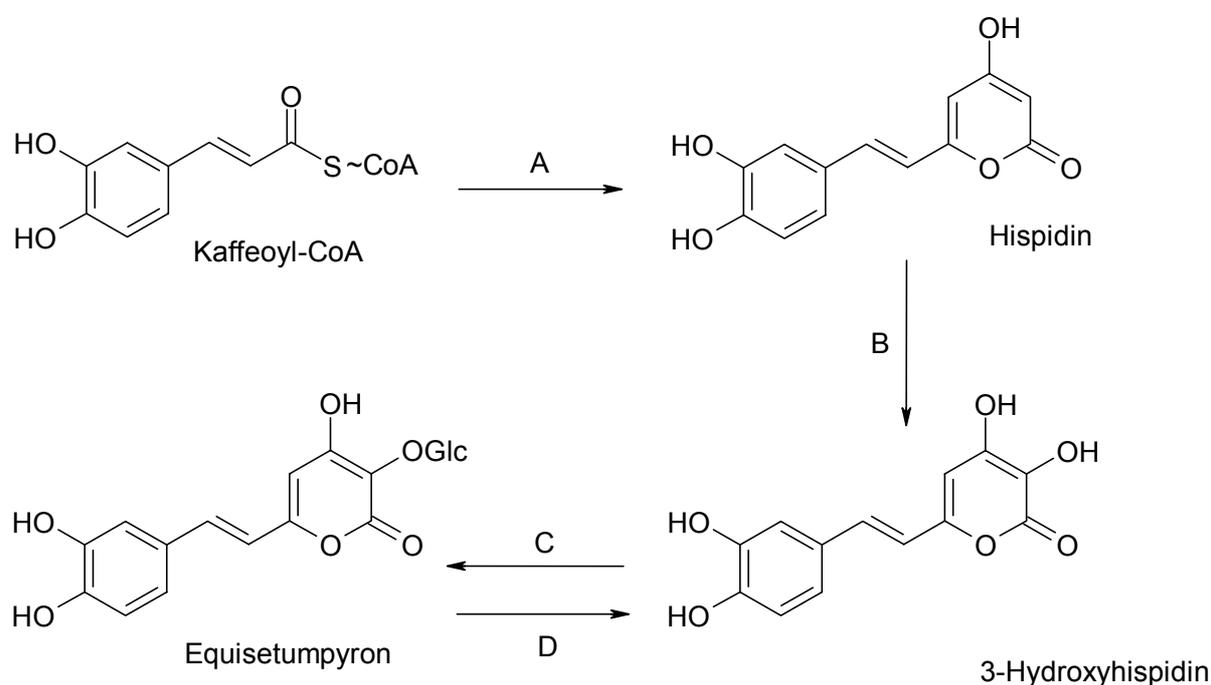


Abbildung 3.8-1: Möglicher Biosyntheseweg zur Bildung des Equisetumpyrons über Kaffeoyle-CoA. A: Styrylpyronsynthese; B: 3-Hydroxylase; C: Glucosyltransferase; D: β -Glucosidase.

Es wurde in Anlehnung an die Arbeiten zur Identifikation von Flavonol 3-O-GlucosylTransferasen aus Zellsuspensionskulturen aus Petersilie von (SUTTER 1973) sowie aus Zellsuspensionskulturen der Sojabohne von (POULTON 1977) gearbeitet.

POULTON, SALEH und SUTTER beschrieben eine Simulation der Transferase Aktivität durch Zugabe von BSA im *in-vitro*-Enzymtest (POULTON 1977, SALEH 1976, SUTTER 1972), sowie die Zugabe von β -Mercaptoethanol konnte bei einigen Glucosyltransferasen eine Aktivitätssteigerung hervorrufen (CHENG 1994, ISHIKURA 1990). Zur Entwicklung eines *in-vitro*-Enzymtests wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, in denen jeweils Parameter zur Proteinextraktion oder zu den Inkubationsbedingungen geändert wurden. Um enzymatisch katalysierte Reaktionen von nicht enzymatisch katalysierten Reaktionen zu unterscheiden, wurde jeweils ein Kontrollansatz mit hitzedenaturierter Proteinlösung durchgeführt. Zur Erfassung möglicher Nebenreaktionen wurden in sämtlichen

Versuchsreihen beide Substrate: 3-Hydroxyhispidin und UDP-Glucose auch jeweils einzeln inkubiert um Reaktionsprodukte, die nur auf eines der beiden Substrate zurückzuführen sind, erkennen zu können.

Mit diesen gewählten Bedingungen, mit suboptimalen, niedrigen pH-Werten sollte das Substrat 3-Hydroxyhispidin stabil gehalten werden. Dies wurde auch nach Verkürzung der Inkubationszeiten nicht erreicht. 3-Hydroxyhispidin in den Kontrollansätzen konnte nicht mehr detektiert werden. Der Zusatz von Natriumascorbat (20-mM) verbesserte die Stabilität unter den Assaybedingungen erheblich. Der Abbruch der Inkubation durch Zugabe von Ethanol konnte eine Veränderung der entstanden Substanzen und der Ausgangssubstanzen nicht verhindern, Dies wurde durch sofortiges Einfrieren nach erfolgter Inkubation und anschließender Gefriertrocknung der Ansätze erreicht. Die Ansätze wurden vor der HPLC-Analyse in Methanol aufgenommen. Weiterhin konnte durch die Inkubation des Equisetumpyrons unter den jeweils gewählten Bedingungen eine β -Glucosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Equisetumpyron wurde vollständig in 3-Hydroxyhispidin überführt. Durch Verwendung eines Tris-Puffers und Anhebung des pH-Wertes auf pH-8,0 konnte diese Aktivität im Proteinextrakt unterdrückt werden. Der Natriumascorbat Zusatz verbesserte die Stabilität des 3-Hydroxyhispidin auch bei diesen pH-Werten, so waren die pH-Bedingungen wie für andere Glucosyltransferasen schon beschrieben, optimal gewählt. So konnte die Bildung von Equisetumpyron im *in-vitro* Enzymtest nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.8-2 und Abbildung 3.8-3 des Kontrollansatzes). Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der *on-line* UV-Spektren und durch Coelution mit isoliertem Equisetumpyron.

Ergebnisse

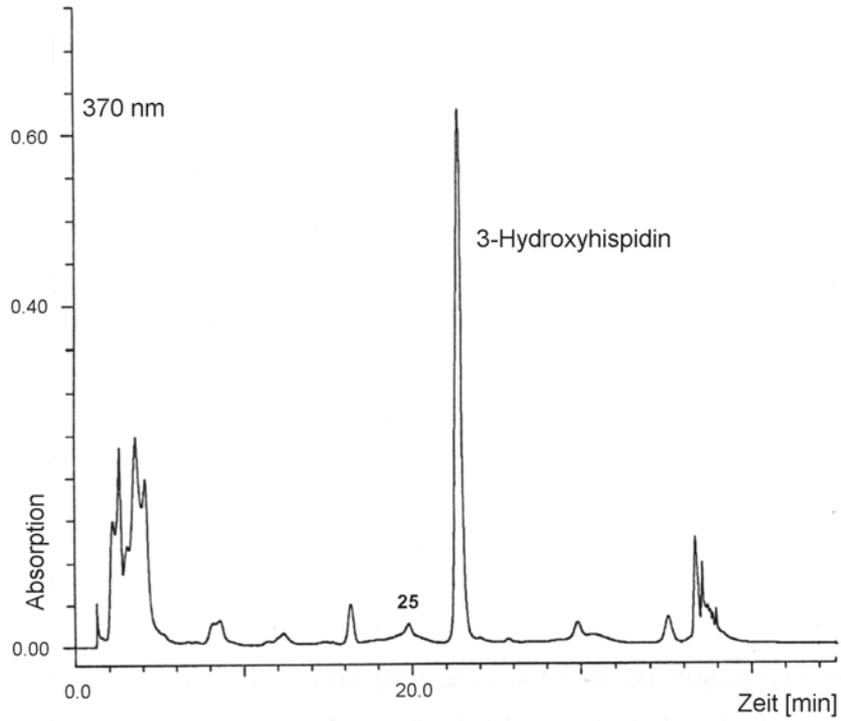


Abbildung 3.8-2: HPLC-Chromatogramm des Ansatzes zum Nachweis der Bildung von Equisetumpyron im *in-vitro* Enzymtest.

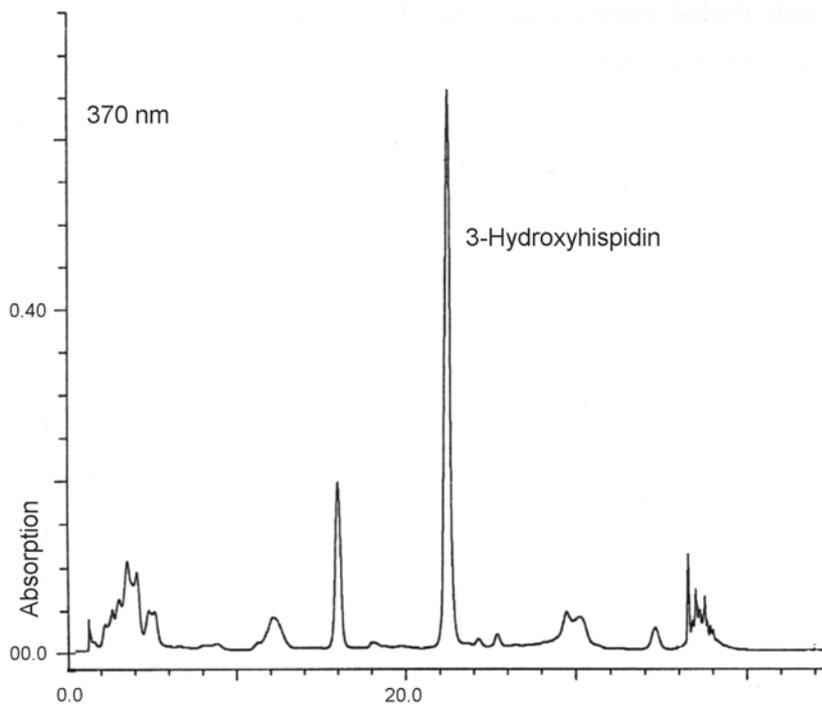


Abbildung 3.8-3: Chromatogramm des Kontrollansatzes zum Nachweis der Bildung von Equisetumpyron im *in-vitro* Enzymtest.

4 DISKUSSION

Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe

Nachdem aus den oberirdischen Pflanzenteilen der Sporophyten von *Equisetum*-Arten ein sehr diverses Spektrum von Flavonoidglykosiden und anderen Phenolen isoliert werden konnte (VEIT *et al.* 1990B, VEIT *et al.* 1995A, VEIT *et al.* 1995B) wurden mit dieser Arbeit die Untersuchungen zur Akkumulation von Phenolen in den Equiseten auf die Gametophyten und Rhizome ausgeweitet. In diesen Organen akkumulierten die Pflanzen keine Flavon-Derivate. Es konnten in allen untersuchten Taxa des Genus *Equisetum* Phenol-Derivate der Inhaltsstoffgruppen Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate nachgewiesen werden. Sie können deshalb als typische Inhaltsstoffgruppe dieser Gattung angesehen werden. Die detektierten Akkumulationsmuster der Styrylpyrone verschiedener Arten waren weitgehend gleich. Unterschiede zeigten sich im Gehalt einzelner Komponenten. *Equisetum arvense* L. nimmt dabei innerhalb des Subgenus *Equisetum* eine gewisse Sonderstellung ein, da nur bei dieser Art höhere Gehalte an *p*-Methoxyequisetumpyron gefunden wurden. Das Pyronspektrum kann aber trotz Fehlens einzelner Spurenkomponenten in einigen Proben verschiedener Arten, im gesamten Subgenus als gleich bezeichnet werden. Auch die intraspezifische Variation, die bei Rhizomen von *E. arvense* an mehreren Pflanzen untersucht wurde, war im Gegensatz zu den Flavonoidmustern oberirdischer Triebe gering. In Rhizomen von *E. arvense* kommt Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure vor, während verschiedene andere Arten nur das entsprechende Monoderivat akkumulieren. Andererseits konnte in gametophytischen Geweben aller untersuchten Arten die Dikaffeoyl-*meso*-weinsäure nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Gene zur Biosynthese dieser Säure offensichtlich in allen Arten vorhanden sind, aber in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich exprimiert bzw. reguliert werden. Die an der Biosynthese beteiligten Coenzym A-Ester abhängigen Transferasen sowohl zur Bildung des Monoderivates als auch des Dikaffeoylderivates wurden von HOHLFELD für *E. arvense* Gametophyten untersucht und sehr weitgehend charakterisiert (HOHLFELD 1996).

Als ein Art- bzw. Sektions-spezifisches Merkmal kann die Akkumulation von Protoflavonoiden in Rhizomen von *E. fluviatile* und *E. arvense* gewertet werden. Diese seltenen Flavonoide mit modifiziertem Ring-B wurden vor allem in fertilen Sporophyten detektiert (HAUTEVILLE *et al.* 1981, VEIT *et al.* 1990A, VEIT *et al.* 1995B). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Protoflavonoide sowohl in Rhizomen von Hybriden von *E. fluviatile* als auch in Prothallien und Rhizomen der Elternart *E. fluviatile* selbst gefunden. Protoapigenin-4'-*O*-glucosid kann daher als typische Komponente von *E. fluviatile* bezeichnet werden. Geringe Mengen an detektiertem Apigenin-4'-*O*-glucosid könnten einen Artefakt darstellen. Bei HAUTEVILLE wird ein Reaktionsmechanismus vorgestellt, wie Protogenkwain-4'-*O*-glucosid zu Genkwain-4'-*O*-glucosid bzw. zu Genkwain umgewandelt werden kann (HAUTEVILLE *et al.* 1981). Nach Abspaltung von Wasser durch Säure- oder Hitzeeinwirkung kommt es am Ring-B zur Umlagerung der Doppelbindung und zur Ausbildung eines aromatischen Ringsystems. Die Abspaltung des Zuckers kann

enzymatisch oder ebenfalls unter Säureeinwirkung erfolgen. Eine gleichartige Reaktion ist von Protoapigenin-4'-O-glucosid zu erwarten. Da Protoflavonoide unabhängig von Flavonoiden akkumulieren, ist es wenig wahrscheinlich, dass diese durch Umbaureaktionen aus Flavonoiden hervorgehen. Somit ist ein unabhängiger Biosyntheseweg für diese Verbindungen zu postulieren.

Innerhalb einer Art wurden in den unterirdisch wachsenden Organen der Knöllchen und der Adventivwurzeln die gleichen Inhaltsstoffmuster festgestellt. Die Gehaltsunterschiede in Knöllchen und auch in verschiedenen Rhizomproben lassen sich durch Unterschiede im Trockengewicht erklären, die durch das Ausmaß der Stärkespeicherung bedingt sind. Insgesamt zeigten die Rhizome im Gegensatz zu oberirdischen Sprossen geringere Gehaltsschwankungen. In unterirdischen Dauergeweben werden offenbar keine Umwelteinflüsse wirksam, die auf eine Synthese und Speicherung sekundärer Inhaltsstoffe Einfluss haben, wie beispielsweise die UV-B Strahlung auf die Synthese und Akkumulation von Flavonoiden in oberirdischen Sprossen (VEIT 1990, WEIDNER *et al.* 1991). Eine jahreszeitabhängige Akkumulationsdynamik von Hydroxyzimtsäurederivaten, wie sie in oberirdischen Sprossen auftritt, konnte in Rhizomen bisher nicht signifikant nachgewiesen werden.

Dagegen konnten bei der Untersuchung der apikalen Wachstumsspitzen der Rhizome deutliche Unterschiede zu den ausdifferenzierten Rhizomen festgestellt werden. Die Wachstumsgewebe zeigten auffallend höhere Gehalte (bezogen auf das Trockengewicht) und komplexere Inhaltsstoffmuster im Vergleich zu den ausdifferenzierten Rhizomen. Die hohe Konzentration an Phenolen in diesen Geweben lassen sich nur teilweise durch den deutlich niedrigeren Anteil an Gerüstsubstanzen und fehlenden Reservepolysacchariden und damit durch das geringere relative Trockengewicht erklären. Vielmehr resultieren der höhere Gehalt sowie die diversen Muster an Sekundärstoffen offenbar aus der noch weitgehend fehlenden Einlagerung solcher Substanzen in Zellwände der Rhizomrinde, verbunden mit einer erhöhten Konzentration löslicher, vakuolär gespeicherten Komponenten. Die fehlende Pigmentierung der Rinde deutet ebenfalls darauf hin.

Nach näherer Untersuchung des Übergangs Rhizom zu oberirdischem Spross (5-6 Internodien von den letzten bewurzelten bis zum ersten deutlich grünen Internodium) wurde ein Wechsel im Akkumulationsmuster der phenolischen Inhaltsstoffe festgestellt. In den Internodien des mittleren Bereiches konnten Styrylpyrone und Flavonoide nachgewiesen werden. Weitergehende Untersuchungen müssten nun zeigen, ob die Zellen dieses Bereiches tatsächlich in der Lage sind, beide Stoffgruppen zu synthetisieren und / oder zu akkumulieren, oder ob ein Transport dieser Sekundärstoffe im Gewebe stattfindet. Untersuchungen von Phloem- und Xylemsaft würden genaueren Aufschluss geben. Denkbar wäre auch, dass innerhalb eines Internodiums in einzelnen Zellen nur Styrylpyrone oder Flavonoide akkumuliert werden. Dies lässt sich nach den durchgeführten Untersuchungen nicht sicher ausschließen, da immer nur ganze Internodien extrahiert und analysiert wurden. Die Analyse der Prothallien zeigte, dass die Kulturbedingungen und die Subkulturdauer einen Einfluss auf die Akkumulation und Diversität der Styrylpyronmuster haben. Hohe Gehalte wurden vor allem in braun pigmentierten inneren Bereichen länger subkultivierter Prothallien gefunden. Das polsterartige dichte Wachstum tritt nur auf zuckerhaltigem

Kulturmedium auf. Dies konnte durch Vergleich zu gleich lang subkultivierten Pflanzen auf zuckerfreiem Medium gezeigt werden. Inwiefern die Kulturbedingungen, insbesondere das zuckerhaltige Medium einen direkten Einfluss auf die Sekundärstoffsynthese haben, oder inwiefern weitere Faktoren wie z.B. unterschiedliche Lichtexposition der Gewebe bei Wachstum und Ausbildung pigmentierter Bereiche eine Rolle spielen, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Führt man die höheren Gehalte der inneren Bereiche auf Lichtmangel zurück, ergibt sich ein gewisser Widerspruch zu einer festgestellten lichtinduzierten Synthesesteigerung der Styrylpyrone, die bei *Polyporus hispidus* beschrieben wurde (BU'LOCK J. D. 1962). Betrachtet man aber auch die Rhizome, ist auffällig, dass bei Equiseten gerade in den Geweben, die einem Lichteinfluss entzogen sind, Styrylpyrone mit hohen Konzentrationen konstitutiv akkumuliert werden. Zusätzliche Styrylpyrone, die in Prothallien nach längerer Subkulturdauer detektiert wurden, traten ebenfalls hauptsächlich in pigmentierten Geweben auf. Das Retentionsverhalten in der HPLC deutet auf einen im Vergleich zu bekannten Pyronglykosiden lipophileren Charakter hin. Diese Komponenten könnten deshalb Pyronaglykone oder Dipyrone darstellen. Das zellwandgebundene, im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Hydroxyhispidindimer zeigte ähnliche Elutionseigenschaften. Es könnte sich daher bei den Substanzen um strukturell ähnlich gebaute Dimere handeln. Diese Verbindungen könnten enzymatisch über Oxidase- und Peroxidase-Reaktionen gebildet werden, könnten aber auch unspezifisch nicht-enzymatisch gebildete Oxidationsprodukte darstellen.

Intrazelluläre und Interzelluläre Verteilung von Hydroxizimtsäurederivaten und Styrylpyronen in Geweben

Durch ihr Fluoreszenzverhalten ließen sich die Phenole eindeutig in mikroskopischen Präparaten identifizieren und ihre Verteilung im Gewebe darstellen. Die vakuoläre Akkumulation der phenolischen Inhaltsstoffe konnte für beide Gewebe, Rhizome und Prothallien, bestätigt werden. Hydroxizimtsäurederivate ließen sich nicht eindeutig selektiv darstellen. Neben technischen Gründen (geeignete Bandpassfilter an Fluoreszenzmikroskopen) sind möglicherweise die spektralen Unterschiede (Emissionsmaxima) der beiden Stoffgruppen nicht ausreichend für eine Differenzierung (siehe Abschnitt 3.3). Das Vorhandensein Hydroxizimtsäurederivaten in Vakuolen und Zellwänden konnte aber durch Vergleich der Emissionsmuster der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bei verschiedenen Anregungswellenlängen bestätigt werden. Ihren Schwerpunkt der Einlagerung scheinen sie bei *E. arvense* im Zentralzylinder zu haben. Styrylpyrone konnten dagegen hinreichend fluoreszenzmikroskopisch identifiziert werden. Die Fluoreszenzmuster bei verschiedenen Anregungswellenlängen zeigten, dass in Rhizomen von *E. arvense* in Zellwänden im ganzen Querschnitt mit Schwerpunkt in der Rinde vorkommen. In weiter außen liegenden Bereichen der Rhizomrinde ließen sich die Gewebe nur längerwellig anregen und fluoreszierten dementsprechend auch nur im längerwelligen Bereich. Diese Fluoreszenzeigenschaften waren von einer gleichzeitig auftretenden lichteptischen Gelb- bis Braunfärbung der Zellwände begleitet. In dunkelbraun bis schwarz pigmentierten Geweben fehlte eine

Fluoreszenz völlig. Diese Beobachtungen, die sowohl an Epidermen der Rhizome als auch an einzelnen Zellen der Prothallien gemacht wurden, sind möglicherweise auf eine stufenweise Polymerbildung von Styrylpyronen in Zellwänden der Gewebe zurückzuführen. Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung von Frischpräparaten konnte eine Fluoreszenz von plasmolysierten Vakuolen und von Zellwänden beobachtet werden. Die Fluoreszenz blieb auch nach erschöpfender Extraktion mit unterschiedlichsten Lösungsmitteln und anschließender Alkalibehandlung erhalten. Durch diese Befunde erscheint es unwahrscheinlich, dass die Fluoreszenz in Zellwänden in mikroskopischen Schnitten durch Anlagerung vakuolärer Komponenten nach Zerstörung der Protoplasten zustande kommen könnte. Diese Beobachtung spricht auch für eine weitgehend alkaliresistente Wandbindung der phenolischen Inhaltsstoffe neben einem Anteil von hydrolytisch extrahierbaren wandgebundenen Komponenten gibt es offenbar einen weiteren Anteil mit alkaliresistenten Wandbindungen, was Fragen zur chemischen Bindung der Phenole an die Zellmatrix aufwirft. Gleichbleibende Fluoreszenzmuster phenolischer Komponenten nach Behandlung mit heißer Lauge wurden beispielsweise an elicitierten Petersiliensämlingen beobachtet, woraus eine nicht-esterartige Bindung wandgebundener Phenole postuliert wurde (JAHNEN und HAHLBROCK 1988).

Bei der chemischen Untersuchung zur Zellwandbindung phenolischer Komponenten wurde durch saure Hydrolyse mit Dioxan-HCl ein Styrylpyron extrahiert, das mit Vorbehalt als Hydroxyhispidindimer identifiziert werden konnte (siehe Abschnitt 3.1). Eine entsprechende Substanz konnte nach alkalische Hydrolyse nicht nachgewiesen werden. Pyrone sind auf Grund ihrer Lactonstruktur alkalilabil und wurden möglicherweise aus diesem Grund nach NaOH-Behandlung der Rhizome nicht detektiert. Eine rasche Zersetzung von Equisetumpyron unter alkalischen Bedingungen war bereits von VEIT beobachtet worden (VEIT *et al.* 1992A). Eine Öffnung des Pyronringes und der Abbau der Kohlenstoffkette durch Abspaltung von C1-(Ketospaltung) und C2-Fragmenten (Säurespaltung-Retroclaisen-kondensation) sind möglich (MORTIMER 1987). Die nach alkalischer Hydrolyse verbleibende Wandfluoreszenz kann auf eine nicht vollständige Freisetzung ester- oder ethergebundener Komponenten (STRACK 1988B) oder auf das zusätzliche Vorliegen von über C-C Brücken gebundenen Styrylpyronen zurückgeführt werden. In dieser Weise könnten auch die Hydroxymethylsäurederivate eingelagert sein, die im Rahmen der gemachten chemischen Untersuchungen nicht nachgewiesen wurden.

Zellwandgebundene Hydroxymethylsäurederivate wurden in zahlreichen Arbeiten beschrieben. Hauptsächlich werden estergebundene *p*-Cumarsäure und Ferulasäure auch Diferulasäure und Chlorogensäure (AERTS 1994) gebunden an Polysaccharide und Lignin gefunden (BOLWELL 1987). Die Freisetzung wandgebundener Phenole mit Dioxan-HCl wird in Untersuchungen mit anderen Pflanzen als Hinweis auf den Einbau von Phenolen in sogenanntes „Björkmann-Lignin“ und auch in „Kohlenhydrat-Lignin Komplexen“ (STRACK 1988B) gewertet. *p*-Hydroxybenzaldehyde konnten zwar als Ligninbestandteile in Schachtelhalmen identifiziert werden (LOGAN und THOMAS 1985), Lignin selbst kann histochemisch aber nur an Gefäßen nachgewiesen werden (MEUSEL 1971).

Möglicherweise sind daher Styrylpyrone an der Bildung von Strukturpolymeren bei Equiseten beteiligt. Vergleichbar wäre dies mit Ergebnissen von verschiedenen Basidiomyceten, wo Styrylpyron-Polymere nachgewiesen wurden (BU'LOCK J. D. 1962, KIRK *et al.* 1975). Die Polymere dieser Pilze sind an Zellwandmaterial gebunden und hydrolyseresistent; ihnen wurde eine ligninartige Funktion zugeschrieben. Bei den pigmentierten Geweben der Equiseten handelt es sich also vermutlich um Bereiche, die durch Styrylpyron-Polymere modifiziert sind. Die dunkel gefärbten Fruchtkörper der Pilze sind als zäh, faserig und damit widerstandsfähiger beschrieben (BU'LOCK J. D. 1962).

Andere Faktoren, die die Styrylpyronsynthese beeinflussen und die auf weitere mögliche Funktionen dieser Phenole hinweisen, konnten durch die Untersuchungen der fleckenartigen Gewebeerbräunungen oberirdischer Sprossquerschnitte festgestellt werden. Die mikroskopische Betrachtungen von Querschnitten dieser Bereiche zeigten mit Rhizomen vergleichbare Fluoreszenzmuster. Gleichzeitig wurde in der HPLC-Analyse ein lokales Auftreten von Styrylpyronen in diesen Zonen festgestellt. Die gelbe Fluoreszenz in diesen Gewebebereichen kann demnach auf eine Einlagerung von Pyronen in die Zellwände zurückgeführt werden. Das Fehlen der Fluoreszenz in deutlich dunkel pigmentierten Zellwänden lässt sich übereinstimmend mit den Beobachtungen bei Rhizomen mit einer Polymerbildung von Styrylpyronen erklären. Die Wandeinlagerung der Pyrone korrelierte mit den ermittelten Gehalten, wonach der lösliche Gehalt von Styrylpyronen in dem weitgehend unpigmentierten Gewebebereich höher lag als im vollständig pigmentiertem Gewebeausschnitt. Die in diesem Rahmen gemachten quantitativen Ergebnisse zeigten lediglich Tendenzen. Die Akkumulation in diesen Bereichen erklärt aber die bei früheren Untersuchungen in sterilen oberirdischen Trieben detektierten Styrylpyrone in geringer, teilweise schwankender Konzentration (VEIT *et al.* 1995B).

Die Gewebeschnitte ließen im mikroskopischen Bild kollabierte, abgestorbene Protoplasten in den Zellen mit pigmentierten Zellwänden erkennen. Die Beobachtungen weisen damit auf eine für Pflanzen typische, unspezifische hypersensitive Abwehrreaktion mit Zelltod hin, die mit einer Wandeinlagerung von phenolischen Komponenten einhergeht (FREYTAG 1992). Solche nekrotischen Erscheinungen werden als Antwort auf biotische oder abiotische Einflüsse beobachtet. In der Tat konnten im Bereich von Verbräunungen an einigen Sprossen Pilzmycelien entdeckt werden; daher handelt es sich nicht um eine bloße Alterserscheinung der Gewebe, obwohl diese Beobachtung vor allem in den späteren Sommermonaten gemacht wurden.

Resistenz gegenüber pathogenem Befall bei Pflanzen kann zum einem durch vorgeformte, eher passive Mechanismen als auch durch aktiv detektierbare Abwehrstrategien zustande kommen (HEITEFUSS 2001). Beobachtungen, die für eine lokal induzierte Synthese sprechen, sind zum einen, dass Pyrone in Geweben der Verbräunungsstellen in oberen Sprossabschnitten detektiert wurden, während sie in darunterliegenden grünen Segmenten nicht nachgewiesen wurden. Zum anderen ging die Pigmentierung stets von der Oberfläche der Gewebe aus. Beides spricht für eine lokal auftretende Synthese der Styrylpyrone und macht einen Ferntransport der Phenole in Leitungsbahnen aus den Rhizomen unwahrscheinlich. Styrylpyrone könnten damit in den Verbräunungsstellen der oberirdischen

Sporophyten als Phytoalexine bezeichnet werden. Allerdings wurde eine antimikrobielle Wirksamkeit für Styrylpyrone aus *Equisetum* noch nicht untersucht, die für Hispidin und Bisnoryangonin jedoch beschrieben wurde (BRADY und BENEDICT 1972). Diese Ergebnisse sind auch im Zusammenhang mit der vermuteten Verwandtschaft von Enzymen im Polyketidstoffwechsel von besonderem Interesse.

Strukturaufklärung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue, bisher unbekannte Styrylpyrone aus Rhizomen von *Equisetum arvense* L. isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Im Vergleich zu Equisetumpyron ergeben sich strukturell bedingt verschiedene Fragen zur Biosynthese. 3'-Dehydroxyequisetumpyron (3,4-dihydroxy-6-(4'-hydroxy-E-styryl)-2-pyron-3-O- β -D-glucopyranosid) unterscheidet sich von Equisetumpyron durch die fehlende Hydroxylgruppe in Position 3'. Es könnte einen eigenen Biosyntheseweg besitzen und sich somit aus *p*-Cumaroyl-CoA ableiten, an das zwei Moleküle Malonyl-CoA kondensiert werden. Das entstehende Bisnoryangonin müsste wie Equisetumpyron in Position 3 hydroxyliert und glucosidiert werden.

p-Methoxyequisetumpyron (3,4-dihydroxy-6-(3'-hydroxy-4'-methoxy-E-styryl)-2-pyron-3-O- β -glucopyranosid) unterscheidet sich von Equisetumpyron durch die paraständige Methoxygruppe in Position 4'. Diese Verbindung könnte einen eigenen Biosyntheseweg besitzen und somit mit Isoferuoyl-CoA gebildet werden. Die weiteren Biosyntheseschritte wären analog zu 3'-Dehydroxyequisetumpyron bzw. Equisetumpyron. Andererseits könnten auch Hispidin oder Equisetumpyron Intermediate der Biosynthese von *p*-Methoxyequisetumpyron sein, indem die Methylierung der aromatischen OH-Gruppen auf der Stufe des Pyrons, anstatt auf der Stufe der Zimtsäureabkömmlinge erfolgt.

Pyron 12 konnte nicht in Mengen isoliert werden, die für kernresonanzspektroskopische Messungen ausreichend gewesen wären. Mit der isolierten Menge konnte ein Protonenspektrum aufgenommen werden, das zwei deutliche Signale anomerer Protonen zeigt. Lage und Kopplungskonstanten beider Signale entsprechen denen, wie sie für Sophorose ((2-O- β -D-glucopyranosid)- β -D-glycopyranosid) in der Literatur beschrieben werden (MARKHAM 1994, VEIT *et al.* 1993A). Dieser Befund wird gestützt durch die erhaltenen massenspektroskopischen Daten. Bei der Verbindung handelt es sich wahrscheinlich um 3-Hydroxyhispidin-3-O-sophorosid. Entsprechende Glykoside der biogenetisch verwandten Flavonoide wurden schon früher in *Equisetum*-Arten beschrieben (VEIT *et al.* 1995B).

Biosynthese der Styrylpyrone in Equisetum

Eine Polyketidsynthese-Aktivität in zellfreien Proteinextrakten aus Gametophyten von *E. arvense* führte zur Bildung von Styrylpyronen, den einzigen Polyketiden in diesen Geweben. Es wurde weder eine Chalconsynthase- noch eine Stilbensynthese-Aktivität detektiert. Deren Reaktionen hätten Styrylpyrone als Nebenprodukte freisetzen können. Es ist offenbar vielmehr ein distinktes Enzym für die Styrylpyronbildung verantwortlich, das wir als Styrylpyronsynthase (SPS), gemäss dem etablierten 3 Charaktercode bezeichnet haben. Die Biosynthesesequenz zur Bildung von Styrylpyronen die sich aus den hier vorgestellten Ergebnissen und den Vergleichen zu anderen Arbeiten ergibt, ist in Abbildung 4-1 dargestellt. In *Equisetum* Gametophyten scheint die von der SPS katalysierte Formation von Bisnoryangonin und Hispidin der erste Schritt einer Biosynthesesequenz zu sein. In nachfolgenden Schritten erfolgt eine Hydroxylierung und Glucosidierung und damit die Bildung von Verbindungen, wie Equisetumpyron. Equisetumpyron ist die Hauptkomponente der gebildeten Styrylpyrone.

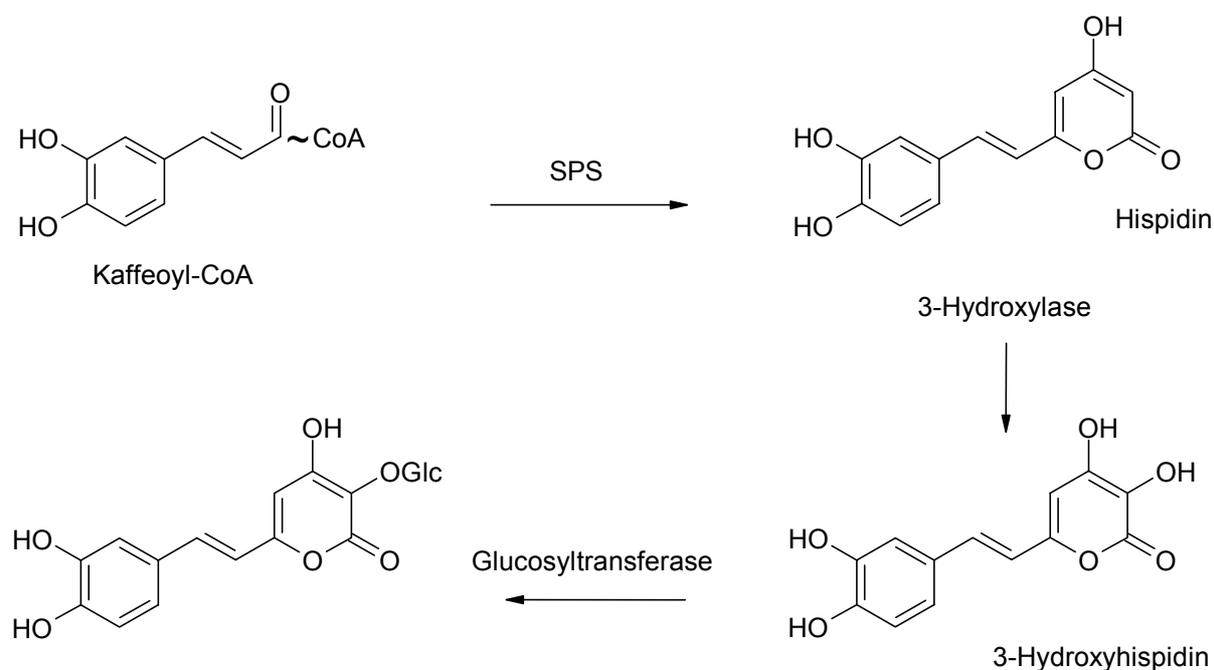


Abbildung 4-1: Biosyntheseweg der Styrylpyrone in *Equisetum*. Beispielhaft dargestellt an der Synthese des Equisetumpyrons mit Kaffeoil-CoA als Startermolekül. SPS: Styrylpyronsynthase. Ausgehend von *p*-Cumaroyl-CoA oder *iso*-Feruloyl-CoA wird vermutlich entsprechend 3'-Dehydroxy-Equisetumpyron und *p*-Methoxyequisetumpyron gebildet.

Bisher ist die Biosynthese von Styrylpyronen nur in Pilzen ausführlich untersucht worden (ZENK 1979). Der dabei an *Polyporus hispidus* aufgeklärte Reaktionsmechanismus wurde für entsprechende Biosynthesen in höheren Pflanzen lediglich postuliert (PERRIN und TOWERS 1973B). Dennoch finden sich in der Literatur eine Reihe von Hinweisen, die auch bei höheren Pflanzen auf eine ähnliche Biosynthese schließen lassen könnten, möglicherweise sogar mit einer direkten Beteiligung von bekannten Enzymen wie der Chalconsynthase oder Stilbensynthase:

Bisnoryangonin wurde beispielsweise als *in-vitro*- Nebenprodukt im Chalconsynthase Enzymtest von Proteinextrakten aus Zellsuspensionskulturen von *Petroselinum hortense* nachgewiesen (Styrylpyrone werden in *Petroselinum hortense* jedoch nicht akkumuliert). Die Styrylpyrone wurden in Anwesenheit sulfhydrylgruppenhaltiger Substanzen als enzymkatalysierte Produkte detektiert bzw. auch bei suboptimal gewählten Enzymtestbedingungen nachgewiesen (HRAZINDA *et al.* 1976, KREUZALER und HAHLBROCK 1975C, SALEH *et al.* 1978, SCHÜTZ *et al.* 1983). Es konnte auch eine Freisetzung von 4-Hydroxy-2-Pyronen als Nebenprodukte in einer CHS- oder STS-Reaktion festgestellt werden, wenn nicht physiologische Substrate wie z.B. aliphatische Coenzym A-Ester mit Malonyl-CoA Molekülen kondensiert wurden (ZUURBIER 1998).

Diese Beschreibungen ließen zunächst auch eine mögliche CHS-Aktivität bei der Bildung von Styrylpyronen in *Equisetum* vermuten. Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester würden dabei mit Malonyl-CoA Molekülen verknüpft werden. Ein Abbruch der Reaktion würde vor der Anlagerung des dritten Malonyl-CoA Moleküls stattfinden. Nachdem mit dieser Arbeit jedoch die SPS in *Equisetum* als distinktes Enzym nachgewiesen werden konnte erscheinen die oben aufgelisteten Beobachtungen in einem neuen Licht. Nebenprodukte bei *in-vitro* Enzymtests von Polyketiden weisen auf Ähnlichkeiten der Biosynthesewege und der beteiligten Enzymsysteme hin. Strukturelle Ähnlichkeiten, zu Vertretern bekannter Enzyme aus der Familie der Polyketidsynthasen wie CHS, STS und 2PS (2-Pyronsynthase) sind gegeben, gestützt durch die Charakterisierungsdaten der SPS (siehe auch Abbildung 1.3-8 und Tabelle 1.3-2 in Abschnitt 1.3; soweit bekannt sind hier unter anderem jeweils Informationen zu Temperaturverhalten, pH-Wert Abhängigkeiten sowie kinetischen Daten und das Molekulargewicht angegeben). Die SPS kann damit auch als neues Mitglied in der Familie der Polyketidsynthasen betrachtet werden. Die untersuchten biochemischen Charakteristika der SPS werden im folgenden im Vergleich zu denen anderer Polyketidsynthasen dargestellt.

Enzymtests mit partiell gereinigter Styrylpyronsynthase von *E. arvense* Gametophyten zeigten, dass *p*-Cumaroyl-CoA bei einem pH-Wert von pH 5,8-10,0 in verschiedenen Puffern als Substrat akzeptiert wurde. Kaffeoyl-CoA konnte stattdessen nur in Kalium-Phosphat-Puffern in einem pH Bereich von 6,0-7,5 als Substrat verwendet werden. Ein ähnlich unterschiedliches pH-Verhalten für diese zwei Substrate wurde auch bei Chalconsynthasen aus unterschiedlichen Pflanzen beobachtet (BEERHUES und WIERMANN 1984, DE COOMAN *et al.* 1993, HINDERER und SEITZ 1985, SALEH *et al.* 1978, SPRIBILLE und FORKMANN 1982, STICH und FORKMANN 1987, STOTZ 1984, WELLE und GRIESEBACH 1987). Wenn Styrylpyrone bei Kaffeoyl-CoA als Hydroxyzimtsäure-CoA-Starter als Nebenprodukte detektiert wurden, dann ebenfalls nur in diesem eingeschränkten pH-Bereich. In allen publizierten Experimenten wurde Kalium-Phosphat-Puffer verwendet. Ob bei anderen Puffersystemen ebenfalls eine Umsetzung mit Kaffeoyl-CoA ausblieb, wie für die SPS getestet, ist unklar. Abweichende Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme auf der Basis primärer Amine in Verbindung mit Zusatz von Mercaptoethanol wurden von KOUNDAL beschrieben und diskutiert (KOUNDAL 1983). Tris beispielsweise stimuliert sowohl die Autooxidation von Mercaptoethanol als auch die der Sulfhydrylgruppen von Proteinen durch Sauerstoff analog zur Mercaptoethanoloxidation, womit die gewünschte Schutzfunktion des Antioxidanz

verloren geht und die Enzymaktivität stark beeinträchtigt wird. Dies kann die unterschiedlichen Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Puffersubstanzen erklären. Die Verminderung der Styrylpyronsynthase-Aktivität unter schwach alkalischen Bedingungen ist vielleicht auch auf die Bildung von *ortho*-Dichinonen in oxidativen Prozessen zurückzuführen. Diese Prozesse sind sowohl als enzymatische als auch als nicht enzymatische Reaktionen bekannt (CHEYNIER und MOUTOUNET 1992, CILLIERS und SINGLETON 1989). *Ortho*-Dichinone sind Enzyminhibitoren und können Enzymreaktionen hemmen (COOPER 1980, DAVIES 1987A, B). Unter den Bedingungen der Enzymtests können aus *o*-Diphenolen leicht *o*-Dichinone entstehen, die aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung die tatsächliche Substratspezifität maskieren. Eine solche Gefahr besteht immer mit Kaffeoyl-CoA als Substrat bei *in-vitro* Enzymtests. Ergebnisse aus kinetischen Untersuchungen zur Substratspezifität lassen sich daher nur bedingt auf *in-vivo*-Bedingungen übertragen und mit anderen Ergebnissen vergleichen.

Die meisten für die CHS publizierten Daten weisen auf *p*-Cumaroyl-CoA als physiologischem Substrat hin (FORKMANN 1999). Bei Arbeiten zur Biosynthese von Kaffeesäureestern in *E. arvense* Gametophyten wurde gezeigt, dass Kaffeesäureester von Hydroxyzimtsäure-CoA abhängigen Transferasen gebildet werden, die vor allem Kaffeoyl-CoA als Substrat akzeptieren verglichen mit *p*-Cumaroyl-CoA als Substrat (HOHLFELD 1998, 1996). Die apparenten Michaelis-Konstanten (K_m -Werte) für die beiden Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester zeigten eine etwas höhere Affinität zu Kaffeoyl-CoA (mit 116 μ M) als zu *p*-Cumaroyl-CoA (mit 182 mM). Dies lässt wie bei den Hydroxyzimtsäure-CoA abhängigen Transferasen aus *Equisetum* Gametophyten den Schluss zu, dass die Synthese des Equisetumpyrons überwiegend von Kaffeoyl-CoA als Startermolekül ausgeht. Die bestimmten K_m -Werte liegen wie die für andere Polyketidsynthasen bestimmten Werte im μ molaren Bereich, teilweise 10-100 fach höher. Die höher bestimmten K_m -Werte für die SPS können zum Teil auf Nebenreaktionen zurückzuführen sein. In den angereinigten Proteinextrakten war zum Beispiel eine gleichzeitige Phenolaseaktivität, die aus den Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester die entsprechenden Hydroxyzimtsäuren freisetzte, nicht vollständig unterdrückt worden.

Gemeinsamkeiten der SPS mit anderen Polyketidsynthasen bestehen im Temperaturverhalten (BAUMERT *et al.* 1994, KREUZALER und HAHLBROCK 1975C, KREUZALER *et al.* 1979). Die höchste Umsetzung erfolgte bei 30°C für *p*-Cumaroyl-CoA bzw. 37°C für Kaffeoyl-CoA. Für die beschriebenen Polyketidsynthasen liegen die höchsten Umsatzraten ebenfalls in diesem Temperaturbereich von 30-45 °C, wie für Chalconsynthasen aus *Petroselinum hortense* und *Glycine max* angegeben (KREUZALER und HAHLBROCK 1975A, WELLE und GRISEBACH 1987). Das für die SPS bestimmte native Molekulargewicht mit 78-80 kDa liegt in der gleichen Größenordnung wie die bestimmten Werte für die Chalconsynthase mit 75-88 kDa (HELLER und FORKMANN 1993) oder auch beispielsweise der Acridonsynthase mit 81 ± 4 kDa (LUKACIN 1999). Ob die SPS ebenfalls als Homodimer vorliegt ist noch nicht geklärt.

Die optimierten Extraktions- und Enzymtestbedingungen hinsichtlich der Pufferzusammensetzung und des gewählten Ammoniumsulfatfällungsbereichs für die SPS entsprachen denen, die für die CHS aus unterschiedlichen Geweben und Zellkulturen beschrieben werden (z.B. BEERHUES und WIERMANN 1988, PETERS *et al.* 1988, ZUURBIER *et*

al. 1993). Auch die publizierten Bedingungen für die STS sind ähnlich (GEHLERT *et al.* 1990, ROLFS und KINDL 1984, RUPPRICH und KINDL 1978, SCHANZ *et al.* 1992, SCHÖPPNER und KINDL 1984). Abhängigkeiten der Enzymaktivität von Substanzen wie Natriumascorbat, Mercaptoethanol und Rinderserumalbumin (BSA), die einen stabilisierenden und aktivitätssteigernden Einfluss haben sind auch bei anderen Polyketidsynthesen von Bedeutung (BOREJSZA-WYSOCKI und HRAZDINA 1996, HINDERER und SEITZ 1985, SALEH *et al.* 1978, SCHRÖDER *et al.* 1979).

Die oben angesprochenen Substrataffinität ist für die weitere Betrachtung der Biosynthese der Styrylpyrone zu ihrer glycosidierten Form interessant. Ebenso wie bei der Flavonoidbiosynthese stellt sich die Frage, auf welcher Stufe die Hydroxylierung an 3' des Styrylteils bzw. des B-Ringes der Flavonoide stattfindet. Bei der Flavonoidbiosynthese findet die Hydroxylierung an dieser Position vor allem auf der C15-Stufe statt, wenngleich Enzyme bekannt sind, die sowohl *p*-Cumarsäure zu Kaffeesäure hydroxylieren als auch entsprechende Konjugate wie CoA-Ester umsetzen können (FORKMANN 1999, STOTZ 1984). Da *p*-Cumaroyl-CoA als physiologisches Substrat der CHS gilt, kann man davon ausgehen, dass die Synthese der entsprechenden Flavonoide mit der Hydroxylierung auf C15-Stufe einhergeht. Die Reaktion auf der C-15 Molekülstufe wird durch eine NADPH abhängige Flavonoid-3'-Hydroxylase vermittelt, was durch Enzymtests mit microsomalen Fraktionen verschiedener Pflanzen nachgewiesen werden konnte (BRITSCH *et al.* 1981, FORKMANN 1981, FORKMANN 1999, FRITSCH und GRISEBACH 1975, SPRIBILLE und FORKMANN 1982).

Die 3'-Hydroxylierung von Bisnoryangonin wie auch die von *p*-Cumaroyl-CoA und *p*-Cumarsäure wurde in den Reaktionsansätzen mit Proteinfractionen aus *E. arvense* Gametophyten beobachtet. Hier scheinen Enzyme des Phenolasetyps diese Reaktionen zu katalysieren mit einem pH-Optimum bei pH 7,5. Es wurde kein Hinweis auf eine Cytochrom-P450 abhängige Hydroxylierung im Standard *in-vitro*-Enzymtest erlangt. Dies entspricht den Ergebnissen, die bei der Bearbeitung der Styrylpyronbiosynthese in Pilzen erhalten wurden. In gereinigten Proteinfractionen wurde sowohl *p*-Cumarat zu Kaffeoylat als auch Bisnoryangonin zu Hispidin hydroxyliert bei einem pH-Optimum von pH 7,5. Diese Enzyme wurden ebenfalls in der „löslichen Proteinfraction“ lokalisiert (NAMBUDIRI *et al.* 1973, 1974, PERRIN und TOWERS 1973B, TOWERS *et al.* 1974, VANCE *et al.* 1974).

Glycosidierungen von Flavonoiden stellen in der Regel den letzten Schritt der Biosynthese dar und folgen meist auch Methylierungen (BAJAJ 1983, ISHIKURA 1990, KÖSTER 1981). Die Glycosidierung der Styrylpyrone in *E. arvense* könnte ebenfalls der letzte Schritt der Biosynthese sein. Substrate dieser Reaktion für die bisher isolierten Styrylpyronglucoside wären Bisnoryangonin, Hispidin und *p*-Methoxyhispidin. Hier ergeben sich Parallelen zur Flavonoidbiosynthese. Während einige Flavonoid Glycosyltransferasen ein breites Spektrum von Substraten umsetzen können (SALEH 1976, SUTTER 1972), wird für andere eine ausgeprägte Substratspezifität beschrieben (BAJAJ 1983, KÖSTER 1981). Für eine hohe Substratspezifität könnten dabei Substitutionsmuster verantwortlich gemacht werden. Beispielsweise kann eine Flavonol-3-O-Glycosyltransferase aus *Citrus paradisi* nur Flavonole mit einer freien Hydroxylgruppe in Position 7 glucosidieren, nicht dagegen die in dieser Position methylierte Verbindung (MC INTOSH 1990). Die Glucosidierung eines

Isoflavons in Position 4' mit einer Isoflavon-4'-Glucosyltransferase aus *Prunus x yedoensis* erfolgt bevorzugt, wenn die Hydroxylgruppe in Position 7 methyliert ist (ISHIKURA 1990). Auch in den Styrylpyronen von *E. arvense* befinden sich die Substitutionen nicht in unmittelbarer Umgebung der zu glucosidierenden Hydroxylgruppe am Pyronring (siehe Abbildung 4-1). Die Lage der zu glucosidierenden OH-Gruppe weist auf sehr spezifische Glucosyltransferasen hin. Glucosyltransferasen für Flavonoide aus anderen Pflanzen können häufig die Hydroxylgruppe in Position 5 der untersuchten Flavonoide nicht glucosidieren, da sie eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe in Position 4 ausbildet (CHENG 1994). Solche Verbindungen sind daher sehr selten. In *E. arvense* findet man jedoch eine Reihe verschiedener Flavon-5-O-Glucoside (VEIT 1990). Auch die Hydroxylgruppe in Position 3 des Pyronrings kann zur Carbonylgruppe in Position 2 eine Wasserstoffbrücke ausbilden. Möglicherweise sind an der Bildung der Styrylpyronglucoside in *Equisetum* ähnliche oder gleiche Enzyme beteiligt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Untersuchungen zur **Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe** von *Equisetum* wurden gametophytische und sporophytische Gewebe analysiert. Die Arbeiten bauten dabei auf vorliegenden Ergebnissen zur Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe in oberirdischen sporophytischen Geweben auf. Sie ergänzten diese Daten hinsichtlich der unterirdischen sporophytischen Geweben (Rhizome, Wurzeln, Speicherknöllchen) und gametophytischer Gewebe (Prothallien). In diesen beiden Geweben konnten – wie in oberirdischen sporophytischen Geweben – Hydroxyzimtsäurederivate nachgewiesen werden. Styrylpyrone und Protoflavonoide ersetzen, die in oberirdischen sporophytischen Geweben nachgewiesenen Flavonoide. Es wurden insgesamt 15 verschiedenen *Equisetum*-Taxa untersucht und der jeweilige Gehalt bestimmt (angegeben in % Trockengewicht). Beim Vergleich von Inhaltsstoffmustern zeigte sich eine organspezifische Akkumulation phenolischer Sekundärstoffe. Als wichtige Grundlage der Untersuchungen wurden axenische Gametophytenkulturen der untersuchten Equiseten-Taxa angelegt und die diesbezüglichen Kulturbedingungen optimiert.

Hydroxyzimtsäurederivate wurden in Prothallien (Gametophyten) aller untersuchter Arten gefunden wohingegen in Rhizomen der jeweiligen Arten einzelne Hydroxyzimtsäurederivate teilweise fehlten. Protoflavonoide wurden nur in Gametophyten und Rhizomen von *E. fluviatile* und dessen Hybriden detektiert.

Eine Abhängigkeit des Styrylpyrongehaltes der **gametophytischen Gewebe** von der Subkulturdauer wurde beobachtet. Mit zunehmender Subkulturdauer stieg der Gehalt an löslichen Styrylpyronen (angegeben in % Trockengewicht). Gleichzeitig konnte an Geweben mit längerer Subkulturdauer (ab 60 Tagen) ein Styrylpyronmuster mit höherer Diversität festgestellt werden. Getrennte Untersuchungen von Gewebeproben ergaben, dass diese lipophileren Styrylpyronderivate, im Vergleich zu den bekannten Styrylpyronen, in den braun gefärbten inneren Bereichen der Gametophyten zu finden waren. Diese Erscheinungen konnten auch als Folge der Kulturbedingungen gewertet werden, nachdem derartige verbräunte Prothallienorgane nur an Pflanzen vorkamen, die auf zuckerhaltigem Medium kultiviert wurden.

Inhaltsstoffmuster unterirdischer **sporophytischer Gewebe** zeigten eine geringe Diversität. Die Inhaltsstoffmuster der Styrylpyrone bei verschiedenen Arten entsprachen sich weitgehend. In Apikalbereichen von Rhizomen wurde im Vergleich zu ausdifferenzierten Rhizomgeweben ein komplexeres Akkumulationsmuster sowie ein höherer Gehalt an Styrylpyronen festgestellt (angegeben in % Trockengewicht). Speicherknöllchen und Adventivwurzeln entsprachen im Inhaltsstoffmuster dem der Rhizome. Rhizome der untersuchten Hybriden zeigten ein zwischen den Elternarten intermediäres Inhaltsstoffmuster.

Die sukzessive Analyse des Übergangsbereiches - unterirdisch wachsendes Rhizom zu oberirdischem Spross - zeigte einen ebenso sukzessiven Wechsel im Akkumulationsmuster. Der Gehalt löslicher Styrylpyrone nahm - von unten nach oben betrachtet - in gleichem Maße ab, wie der Gehalt an Flavonoiden anstieg. Hydroxyzimtsäurederivate wurden jedoch in allen untersuchten Abschnitten mit etwa gleichen Gehalten gefunden.

In lokal braun pigmentierten Sprossbereichen, die vereinzelt an oberirdisch wachsenden Sporophyten auftraten, wurden neben den in Rhizomen konstitutiv akkumulierten Styrylpyronen auch, offenbar durch Verwundung induziert, akkumulierte Styrylpyrone detektiert. In den grünen, nicht pigmentierten Bereichen dieser Sprosse wurden dagegen ausschließlich Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate detektiert. Die braun pigmentierten Bereiche zeigten im mikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Bild nekrotisierte Zellen und Gewebe, das dem in Rhizomen ähnelte. Im Rahmen der Untersuchungen zu zellwandgebundenen Phenolen konnte ein Styrylpyron extrahiert und als Hydroxyhispidin-Dimer identifiziert werden. Diese Ergebnisse machten eine Beteiligung der Stoffgruppe an der unspezifischen Abwehr (konstitutiv und induzierbar) gegen Mikroorganismen wahrscheinlich. Dabei gibt es zahlreiche Parallelen zu verwandten Stoffklassen mit sehr ähnlicher Biosynthese, wie beispielweise den Stilbenen.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen belegten eine vakuoläre Speicherung der löslichen Inhaltsstoffe Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate in Rhizomen und Prothallien. Durch vergleichende Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Gewebeschnitte von Rhizomen, die bei unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsbereichen aufgenommen wurden, konnte die zelluläre Verteilung der Inhaltsstoffgruppen Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate deutlich gemacht werden. Hydroxyzimtsäurederivate wurden vorwiegend in zentral liegenden Rhizombereichen detektiert, während Styrylpyrone über den gesamten Rhizomquerschnitt verteilt sichtbar gemacht werden konnten.

Im Rahmen der **präparative Arbeiten** konnten folgende neue Styrylpyrone aus Rhizomen von *E. arvense* isoliert und erstmals mit Hilfe spektroskopischer Methoden vollständig in ihrer Struktur aufgeklärt werden:

3,4-Dihydroxy-6-(4'-hydroxy-E-styryl)-2-pyron-3-O- β -D-glucopyranosid

3,4-Dihydroxy-6-(3'-hydroxy-4'-methoxy-E-styryl)-2-pyron-3-O- β -glucopyranosid

Aus Rhizomen von *E. hyemale* wurde eine weitere Styrylpyronkomponente isoliert. Vermutlich handelt es sich dabei um ein 3-Hydroxyhispidin-sophorosid.

Im Rahmen der Untersuchungen zur **Biosynthese von Styrylpyronen** konnte eine enzymkatalysierte Bildung von Hispidin und Bisnoryangonin in Gametophyten verschiedener *Equisetum*-Arten sowie in Rhizomen und fertilen Sporophyten von *E. arvense* nachgewiesen werden. Ebenso gelang der Nachweis der enzymatischen Glycosilierung von 3-Hydroxyhispidin zu Equisetumpyron in Gametophyten von *E. arvense*.

Zur Messung der Styrylpyronsynthase-Aktivität in Gametophyten wurde ein *in-vitro*-Enzymtest entwickelt und etabliert.

Eine **Styrylpyronsynthase** wurde hinsichtlich ihrer Eigenschaften pH-Optimum, Temperaturabhängigkeit, Einfluss verschiedener Substanzen, Zeit- und Substratabhängigkeit charakterisiert und das Molekulargewicht bestimmt:

Das pH-Optimum für die Bildung von Bisnoryangonin lag bei pH 7,5-7,8 und für die Bildung von Hispidin bei 6,8-7,0, jeweils in 0,5 M KP_i -Puffer.

Das Temperaturoptimum für die Bildung von Bisnoryangonin betrug 30° C bzw. 37° C für die Bildung von Hispidin.

Die Substanzen Natriumascorbat in einer Konzentration von 20 mM, BSA (0,1 % w/V), Dithiothreitol (2,5 mM) bzw. Mercaptoethanol (7 mM) konnten die Enzymaktivität deutlich steigern.

Die K_m -Werte wurden für die Substrate Kaffeoil-CoA und Malonyl-CoA (Bildung von Hispidin) bei 116 μ M bzw. 141 μ M ermittelt. Für die Substrate *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA (Bildung von Bisnoryangonin) lagen die K_m -Werte bei 182 μ M bzw. 238 μ M.

Das relative Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde mittels Gelfiltration an Superose 12/HR[®] (FPLC) und Sephacryl S 200[®] mit 78-80 kD bestimmt.

Im Rahmen der **Proteinreinigung** wurde das chromatographische Verhalten der Styrylpyronsynthase an verschiedenen Säulenchromatographiematerialien untersucht. Es wurde eine Methode entwickelt, mit der die Styrylpyronsynthase partiell gereinigt werden konnte. Insgesamt betrug der Anreicherungsfaktor 1107 bei einer Ausbeute von 0,08 %.

Eine weitere Reinigung der Styrylpyronsynthase zur Homogenität mit nachfolgender Strukturaufklärung des Enzyms in Verbindung mit einer Darstellung der Chalconsynthase aus *Equisetum* kann weitere Fragen zur Evolution, Regulation und Funktionalität des Sekundärstoffwechsel in *Equisetum* klären. Die Erarbeitung eines erweiterten Styrylpyronspektrums bildet die Grundlage für pharmakologische Forschungen an Rhizomen

von *Equisetum*.

6 SUMMARY

In the context of the investigations about the accumulation of phenolic compounds of *Equisetum* gametophytic and sporophytic tissues were analyzed. The work based on results for the accumulation of phenolic compounds in aboveground sporophytic tissues. The completion of this data was achieved regarding underground sporophytic tissues (rhizomes, roots, tubers) and gametophytic tissue. As in aboveground sporophytic tissues hydroxycinnamic acids could be detected both in underground and gametophytic tissues. Styrylpyrones and protoflavonoides replaced flavonoids detected in aboveground sporophytic parts. Altogether 15 different *Equisetum* taxa were examined and their respective phenolic content were given in in % dry-weight. Comparing the compounds, an organ-specific accumulation of phenolic compounds showed up. As crucial basis of the studies, axenic gametophytic cultures of all examined *Equisetum* taxa were established and relevant culture conditions were optimized. Without exception, hydroxycinnamic acids were found in gametophytes of all examined species, whereas some rhizomes did not show the complete hydroxycinnamic acid pattern. Protoflavonoids could be detected only in gametophytes and rhizomes of *E. fluviatile* and its hybrids.

The styrylpyrone contents of gametophytic tissues were dependent on the duration of subcultivation. With increasing subcultivation duration the content of soluble styrylpyrones also increased (indicated in % dry weight). Additionally, gametophytes cultivated for more than 60 days showed a higher diversity in their styrylpyrone patterns. Further styrylpyrones could be detected, more lipophilic than those known previously. Separate analysis of tissue-samples indicated that these more lipophilic styrylpyrone derivatives, compared to well known styrylpyrones, were located in brown colored internal areas of the gametophytes. This finding was supposed to depend on culture conditions, as such brown gametophytic tissues occurred only on plants cultivated on sucrose media.

Phenolic patterns of underground sporophytic tissues showed small diversity. Styrylpyrone patterns of different species were quite similar. In apical areas of rhizomes, the pattern was more complex and the content of styrylpyrones (indicated in % dry weight) was higher than in differentiated rhizome tissue. In terms of the component-patterns tubers and roots corresponded to rhizomes. Rhizomes of the examined hybrid taxa showed a component-pattern intermediate parents.

The intermediate segments between underground rhizome and aboveground parts showed a gradual change in the accumulation of phenolics. Looking from the rhizome to the aboveground parts, the content of soluble styrylpyrones decreased in the same degree as the flavonoid content increased. However, hydroxycinnamic acids were detected in all examined parts with approximately equal contents.

Besides constitutively accumulated styrylpyrones in the underground parts mentioned above, styrylpyrones were also detected in brown pigmented spots of barren sprouts, which occurred occasionally at aboveground sporophytes. These styrylpyrones were probably induced due to wounding. In the green, not pigmented areas of these sprouts however, only flavonoids and hydroxycinnamic acids were found. Microscopic and fluorescent microscopic pictures of pigmented spots showed necrotic cells and tissues resembling those of rhizomes. Examinations of cell wall-bound phenolics revealed a styrylpyrone identified as a hydroxyhispidin dimer. These results suggested a contribution of styrylpyrones to non-specific constitutive and inducible defence mechanisms against microorganisms. There are numerous parallels to biosynthetically related metabolites e.g. the stilbenes.

Fluorescent microscopic examinations proved the vacuol storage of soluble styrylpyrones and hydroxycinnamic acids in rhizomes and gametophytes. Comparative analysis of fluorescent-microscopic pictures of rhizomes tissues recorded at different excitation and emission ranges showed the cellular distribution of the compounds styrylpyrones and hydroxycinnamic acids. Hydroxycinnamic acids were predominantly detected in central areas of the rhizomes, whereas styrylpyrones could be made visible over the entire rhizom-cross-section.

The isolation of styrylpyrones from rhizomes of *E. arvense* revealed the following new structures confirmed by spectroscopic methods:

3,4-dihydroxy-6-(4'-hydroxy-E-styryl)-2-pyrone-3-O- β -D-glucopyranosid

3,4-dihydroxy-6-(3'-hydroxy-4'-methoxy-E-styryl)-2-pyrone-3-O- β -glucopyranosid

From rhizomes of *E. hyemale* a further styrylpyrone was isolated. According to spectroscopic data it seemed to be a 3-hydroxyhispidin-sophorosid.

Summary

Investigations on the biosynthesis of styrylpyrones proved an enzyme-catalyzed formation of hispidin and bisnoryangonin in gametophytes of different *Equisetum* species as well as in rhizomes and fertile sporophytes of *E. arvense*. Additionally succeeded the proof of the enzymatic glycosylation of 3-hydroxyhispidin to equisetumpyrone at gametophytes of *E. arvense*.

For the measurement of styrylpyronsynthase activity in gametophytes an *in-vitro* enzyme assay was developed and established. A styrylpyronsynthase was characterized regarding its characteristics pH optimum, temperature dependence, influence of different additives, time and substrate dependency and its molecular weight was determined:

The pH optimum for the formation of bisnoryangonin was observed at pH 7.5-7.8 and for the formation of Hispidin at pH 6,8-7,0, either in 0,5 M KP_i buffers.

The temperature optimum for the formation of Bisnoryangonin was found at 30° C and 37° C for the formation of Hispidin.

The substances sodiumascorbate in a concentration of 20 mM, bovine serum albumin (0.1 % w/V), dithiothreitol (2.5 mM) and mercaptoethanol (7 mM) increased the enzyme activity markable.

The apparent K_m values for the substrates caffeoyl CoA and malonyl CoA (formation of Hispidin) of 116 μ M res. 141 μ M were calculated, whereas for the substrates *p*-cumaroyl-CoA and Malonyl-CoA (formation of Bisnoryangonin) K_m -values of 182 μ M res. 238 μ M were determined.

The relative molecular weight determination of the native enzyme by gel filtration methods (Superose 12/HR® (FPLC)) and Sephacryl S 200®) revealed in 78-80 kD.

In the course of the protein purification the chromatographic behavior of the styrylpyronsynthase at different materials was examined. A method was developed partially purifying the styrylpyronsynthase. Altogether the enrichment factor was 1107 with a yield of 0,08 %.

A further purification of the styrylpyronsynthase to homogeneity followed by its structure identification of the enzyme in connection with a representation of the chalconsynthase from *Equisetum* could answer questions about evolution, regularization and functionality of secondary metabolisms in *Equisetum*.

The extended knowledge styrylpyrone-spectrum lays the foundations of future pharmacological research on *Equisetum* rhizoms.

7 LITERATUR

- Achenbach, H., Karl, W., Smith, S. (1971).** Zur gaschromatographischen Trennung der Kawa-Lactone --(+)-5.6.7.8-Tetrahydroyangonin, ein neues Kawa-Lacton aus Rauschpfeffer. Chem. Ber. 104, 2688-2693.
- Achenbach, H. K., W., Regel, W. (1972).** Inhaltsstoffe des Rauschpfeffers, V) 11-Hydroxy-12-methoxy-dihydrokawain und 11.12-Dimethoxy-dihydrokawain, zwei neue Kawa-Lactone aus Rauschpfeffer (*Piper methysticum* Forst.). Chem. Ber. 105, 2182-2187.
- Adam, W., Saha-Moeller, C. R., Veit, M., Welke, B. (1994).** A convenient synthesis of hispidin from piperonal. Synthesis 11, 1133-1134.
- Adityachaudhury, N., Asit, K., Das & Daskanungo, P. (1976a).** Occurrence of 5,6-Dehydrokawain & 7,8-Epoxy-5,6-Dehydrokawainin *Didymocarpus aurantiaca*. Indian J. Chem. 14 B, 909-911.
- Adityachaudhury, N., DAS, A. K., Daskanungo, P. (1976b).** Occurrence of 5,6-Dehydrokawain in *Didymocarpus aurantiaca*. Indian J. Chem. 14, 127.
- Aerts, R. J. (1994).** Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. J. Exp. Botany 45, 497.
- Ahmad, F. B., Tukol, W. A., Omar, S., Sharif, A. M. (1991).** 5-Acetylgoniothalamin, a styryldihydropyrone from *Goniothalamus uvaroides*. Phytochemistry 30 (7), 2430-2431.
- Ali, A. M., Mackeen, M.M., Hamid, M., Aun, Q.B., Zauyah, Y., Azimathol, H. L.P., Kawazu, K. (1997).** Cytotoxicity and electron microscopy of cell death induced by Goniothalamin. Planta Med. 63, 81-83.
- Ali, N. A. A., Jansen, R., Pilgrim, H., Liberra, K., Lindequist, U. (1996a).** Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus*. Phytochemistry 41(3), 927-929.
- Ali, N. A. A., Lüdtkke, J., Pilgrim, H., Lindequist, U. (1996b).** Inhibition of chemoluminescence response of human mononuclear cells and suppression of mitogen-induced proliferation of spleen lymphocytes of mice by hispolon and hispidin. Pharmazie 51(9), 667-670.
- Alkofahi, A., Ma, W. W., McKenzie, A. T., Byrn, S. R., McLaughlin, J. L. (1989).** Goniatriol from *Goniothalamus giganteus*. J. Nat. Prod 52 (6), 1371-1373.
- Asshauer, J., Ullner, H. (1986).** Methodical prerequisites. In: Practice of high performance liquid chromatography, Engelhardt H., Hrsg., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Bajaj, K. L., De Luca, V., Khouri, H., Ibrahim, R. K. (1983).** Purification and properties of flavanol-ring B, Glucosyltransferase from *Chrysosplenium americanum*. Plant Physiol. 72, 891-896.
- Balza, F., Muir, A. D., Towers, G. H. N. (1985).** 3'-Hydroxypsilotin, a minor phenolic glycoside from *Psilotum nudum*. Phytochemistry 24 (3), 529-531.
- Bandoni, H. J., Moore, K., Subao-Rao, P. V., Towers, G. H. N. (1968).** Phenylalanin and tyrosine ammonia lyase activity in some basidiomyceten. Phytochemistry 7, 205-210.
- Banerji, A., Siddhanta, A. K., Acharyya, A. K., Dutta, C. P. (1980).** Carbon-13 NMR spectroscopy of kawa-pyrone. Org. Magn. Reson. 13 (5), 345-348.
- Barbosa-Filho, J. M., Yosida, M., Gottlieb, O. R., C.S.B.C, B. D., Giesbrecht, A. M., Young, M. C. M. (1987).** Benzoylestere and amide, styrylpyrone and neolignane from the fruits from *Aniba riparia*. Phytochemistry 26 (9), 2615-2617.
- Baumert, A., Porzel, A., Schmidt, J., Gröger, D. (1992).** Formation of 1,3-Dihydroxy-N-methylacridone from N-Methylantraniloyl-CoA by cell-free extracts of *Ruta graveolens*. Z. Naturforsch. C: Biosci 47, 365-368.
- Baumert, A., Maier, W., Gröger, D., Deutzmann, R. (1994).** Purification and properties of acridone synthase from cell suspension cultures of *Ruta graveolens* L. Z. Naturforsch., C: Biosci 49 (1-2), 26-32.

- Beerhues, L., Wiermann, R. (1984).** Two different chalcone synthase activities from spinach. *Z. Naturforsch., C: Biosci* 40 C, 160-165.
- Beerhues, L., Wiermann, R. (1985).** Two different chalcone synthase activities from spinach. *Z. Naturforsch., C: Biosci*, 341-382.
- Beerhues, L., Robenek, H., Wiermann, R. (1988).** Chalcone synthases from spinach (*Spinacia oleracea* L.). II. Immunofluorescence and immunogold localization. *Planta* 173 (4), 544-553.
- Beerhues, L., Wiermann, R. (1988).** Chalcone synthases from spinach (*Spinacia oleracea* L.). I. Purification, peptide patterns, and immunological properties of different forms. *Planta* 173 (4), 532-543.
- Beerhues, L. (1996).** Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaureum erythraea*. *FEBS Lett.* 383 (3), 264-266.
- Benedict, R. G., Brady, L. R. (1972).** Antimicrobial activity of mushroom metabolites. *J. Pharm. Sci.* 61(11), 1820-1822.
- Bermejo, A., Blazques, M. R., Rao, K. S., Cortes, D. (1998).** Styrylpyrones from *Goniothalamus arvensis* stem bark. *Phytochemistry* 47, 1375-1380.
- Bernardi, G. (1962).** Chromatography of proteins. In: *Methods of enzymology*, Colowick S. P., Kaplan, N. O., Hrsg., Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Tokyo, Toronto.
- Billek, G. (1964).** Stilbene im Pflanzenreich. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 22, 115-152.
- Bisswanger, H. (1994).** *Enzymkinetik Theorie und Methoden*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Bittencourt, A. M., Gottlieb, O. R., Mors, W. B., Magalhaes, M. T., Mageswaran, S., Ollis, W. D., Sutherland, I. O. (1971).** Chemistry of the genus Aniba. XV. Natural occurrence of 6-styryl-2-pyrones and their synthesis. *Tetrahedron* 27 (5), 1043-1048.
- Blazquez, M. A., Bermejo, A., Zafra-Polo, M.C., Cortes, D. (1999).** Styryl-Lactones from *Goniothalamus* species - a review. *Phytochem. Anal.* 10, 161-170.
- Blum, P. H., Ames, B. N. (1989).** Immunochemical identification of a tRNA-independent cytokinin-like compound in *Salmonella typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta* 1007 (2), 196-202.
- Bolwell, G. P. (1987).** Synthesis of cell wall components: aspects of control. *Phytochemistry* 11, 2801.
- Borejsza-Wysocki, W., Hrazdina, G. (1996).** Aromatic polyketide synthases. Purification, characterization, and antibody development to benzalacetone synthase from raspberry fruits. *Plant Physiol.* 110 (3), 791-799.
- Borsche, W., Gerhardt, M. (1914).** Untersuchungen über die Bestandteile der Kawa - Wurzel I. Über Yangonin. *Chem. Ber.* 47, 2902-2903.
- Borsche, W., Peitzsch, P. (1930).** Untersuchungen über die Bestandteile der Kawawurzel. X. Über Kawain und Dihydrokawain. *Chem. Ber.* 63, 2414-2417.
- Borsche, W., Peitzsch, W. (1929).** Untersuchungen über die Bestandteile der Kawawurzel. VII. Über Pseudo-methysticin. *Cem. Ber.* 62, 360-367.
- Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the prinziple of proteindye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brady, L. R., Benedict, R. G. (1972).** Occurrence of bisnoryangonin in *Pholiota squarrosoidiposa*. *J. Pharm. Sci.* 61 (2).
- Britsch, L., Heller, W., Grisebach, H. (1981).** Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z. Naturforsch., C: Biosci*, 0341-0382.
- Britsch, L., Grisebach, H. (1985).** Improved preparation and assay of chalcone synthase. *Phytochemistry* 24 (9), 1975-1976.
- Brödenfeldt, R., Mohr, H. (1986).** Use of immunotitration to demonstrate phytochrome-mediated synthesis de novo of chalcone synthase and phenylalanine ammonia lyase in

- mustard seedling cotyledons. Z. Naturforsch. C: Biosci 41(1-2), 61-68.
- Bu`Lock, J. D., Smith, H. G. (1961).** A fungus pigment of novel type , and the nature of fungus `lignin`. Experientia 17, 553-554.
- Bu`Lock J. D., L., P. R., Smith, H. G. (1962).** Pyrones. Part II, Hispidin a new pigment and precursor of a fungus "lignin". J. Chem. Soc., 2085-2089.
- Burkhill, I. H. (1935).** A dictionary of the economic products of the Malaya Peninsula. Crown Agent, London.
- Cheng, G. W., Malenick, D. A., Breen, P. J. (1994).** UDP-Glucose: flavonoid o-glucosyltransferase from strawberry fruit. Phytochemistry 35 (6), 1435-1439.
- Cheyrier, V., Moutounet, M. (1992).** Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. 40 (11), 2038-2044.
- Cilliers, J. J. L., Singleton, V. L. (1989).** Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. J. Agric. Food Chem. 37 (4), 890-896.
- Cooper, T. G. (1980).** Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Cui, C. B., Tezuka, Y., Yamashita, H., Kikuchi, T., Nakano, H., Tamaoki, T., Park, J. H. (1992).** Constituents of a fern, *Davallia mariesii* Moore. III. Revised structure and absolute configuration of davallialactone. Chem. Pharm. Bull. 40 (7), 1711-1717.
- Cummings, L. (1994).** Ceramic Hydroxyapatite offers a new, old chromatography application tool. Genetic Engineering News 14 (17), 312-314.
- Da Mata Rezende, C. M. A., von Bülow, M. V., Gottlieb, O. R., Lamego, V., Pinho, S., Da Rocha, A. I. (1971).** The 2- pyrones of Aniba species. Phytochemistry 10, 3167-3172.
- Dangl, J. L.,(1992).** Genes involved in plant defense. In: Plant gene research Springer, Wien.
- Davies, K. J. A. (1987a).** Protein damage and degradation by oxygen radicals, II. Modification of amino acids. J. Biol. Chem. 262 (15), 9895-9901.
- Davies, K. J. A., Delsignore, M. E., Lin, S. W. (1987b).** Protein damage and degradation by oxygen radicals, I general aspects. J. Biol. Chem. 262 (20), 9902-9907.
- Dewick, P. M. (1985).** The biosynthesis of shikimate metabolites. Nat. Prod. Rep. 2 (6), 495-511.
- Dewick, P. M. (1988).** The biosynthesis of shikimate metabolites. Nat. Prod. Rep. 5 (1), 73-97.
- Dewick, P. M. (1989).** The biosynthesis of shikimate metabolites. Nat. Prod. Rep. 6 (3), 263-290.
- Dewick, P. M. (1994).** The biosynthesis of shikimate metabolites. Nat. Prod. Rep. 11(2), 173-203.
- Duckett, J. G. (1979).** An experimental study of the reproductive biology and hybridization in the European and North American species of *Equisetum*. Bot. J. Linn. Soc. 79 (3), 205-229.
- Duve, R. N. (1981).** Gas-liquid chromatographic determination of major constituents of *Piper methysticum*. Analyst. 106 (1259), 160-165.
- Ebel, J., Hahlbrock, K. (1982).** Biosynthesis of flavonoids. Chapman and Hall, London.
- Eckermann, S., Schröder, G., Schmidt, J., Strack, D., Edrada, R. A., Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Kilpelainen, Proksch, P., Teeri, T. H., Schröder, J. (1998).** New pathway to polyketides in plants. Nature 396, 387-390.
- Edwards, R. L., Lewis, D.G., Wilson, D.V. (1961).** Constituents of higher fungi, part I. Hispidin, a new 4-hydroxy-6-styryl-2-pyrone from *Polyporus hispidus*. Bull. Fr. J. Chem. Soc. 3, 4995-5002.
- Englard, S., Seiffter, S. (1990).** Precipitation Techniques. In: Methods in Enzymology, Deutscher M., P., Hrsg., Academic Press Inc, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 285-306.
- Fang, X.-P., Anderson, J. E., Chang, C.-J., Fanwick, P. E., Mc Laughlin, J. L. (1990).** Novel bioactive styryl-lactones: Goniofufurone, Gonipyrone and 8-Acetylgoniotriol from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae), X-ray molecular structure of Goniofufurone and of Gonipyrone. J. Chem. Soc. Perkin trans 1, 1655-1661.

- Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., Noel, J. P. (1999).** Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* 6, 775-784.
- Fiasson, J. L. (1982).** Chemotaxonomic study of fungi. 44. Distribution of styrylpyrones in the basidiocarps of various Hymenochaetaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 10 (4), 289-296.
- Fiasson, J.-L., Berenillon, J. (1977a).** Identification chimique de styrylpyrones chez quatre Hymenochetacees. *Can. J. Bot.* 55, 2984.
- Fiasson, J.-L., Gluckhoff - Fiasson, K., Steglich, W. (1977b).** Über die Farb- und Fluoreszenzstoffe des Grünblättrigen Schwefelkopfes (*Hypholoma fasciculare*, Agaricales). *Chem. Ber.*, 1047-1057.
- Fliegmann, J., Schröder, G., Schanz, S., Britsch, L., Schröder, J. (1992).** Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.* 18 (3), 489-503.
- Forkmann, G. (1993).** Biosynthesis of flavonoids. In: Polyphenolic Phenom, INRA, Paris, 65-71.
- Forkmann, G., Stotz, G. (1981).** Genetic Control of Flavanone 3-Hydroxylase activity and flavonoid 3'-hydroxylase activity in *Antirrhinum majus* (snapdragon). *Z. Naturforsch.* 36c, 411-416.
- Forkmann, G. H., W. (1999).** Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. In: Comprehensive natural products chemistry, Barto D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Sankawa, U., Hrsg., Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo,
- Franca, N. C., Gottlieb, O. R., Suarez, A. M. P. (1973).** 6-Phenylethyl-5,6-Dihydro-2-pyrones from *Aniba gigantifolia*. *Phytochemistry* 12, 1182-1184.
- Frentzen, K. (1934).** Über die Schachtelhalmgewächse des Keupers. *Aus der Heimat* 47, 147-152.
- Freytag, S., Hahlbrock, K. (1992).** Abwehrreaktionen von Pflanzen gegen Pilzbefall. *Biologie in unserer Zeit* 22 (3), 135.
- Fritsch, H., Grisebach, H. (1975).** Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochemistry* 14 (11), 2437-2442.
- Frohne, D., Jensen, U. (1998).** Systematik des Pflanzenreichs. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Fu, X., Sevent, A., Hamid, A., Hadi, F. R., Pais, M. (1993).** Kurzilactone from *Cryptocarya kurzii*. *Phytochemistry* 33 (5), 1272-1274.
- Gegenheimer, P. (1990).** Preparation of extracts from plants. In: Guide to protein purification, Deutscher M. P., Hrsg., Academic press limited, London, 174-193.
- Gehlert, R., Schoeppner, A., Kindl, H. (1990).** Stilbene synthase from seedlings of *Pinus sylvestris*: purification and induction in response to fungal infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3 (6), 444-449.
- Gill, M., Steglich, W. (1987).** Pigments of fungi. In: Springer, Wien, New York, 88-97.
- Gill, M. (1994).** Pigments of Fungi (Macromycetes). *Nat. Prod. Rep.*, 67-90.
- Gleitz, J., Seitz, H. U. (1989).** Induction of chalcone synthase in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*) by ultraviolet light: evidence for two different forms of chalcone synthase. *Planta* 179 (3), 323-330.
- Gobley, C. (1860).** Recherches chimiques sue la racine de kawa. *J. Pharm. Chim.* 37, 19.
- Goh, S. H., Ee, G. C. L., Chuah, C. H., Wei, C. (1995).** Styrylpyrone derivatives from *Goniothalamus dolichocarpus*. *Australian J. Chem.*, 390.
- Gorbunoff, M. J. (1985).** Protein chromatography on hydroxyapatite columns. *Methods in Enzymology* 182, 329-343.
- Gottlieb, O. R., Veloso, D. P., Pereira, M. O. d. S. (1975).** Photochemistry of natural products. I. Photodimerization of 4-methoxy-6-(E)-styryl-2-pyrone. *Rev. Latinoam. Quim* 6 (4), 188-190.

- Gottlieb, R. (1972).** Chemosystematic of the Lauraceae. *Phytochemistry* 11, 1537 - 1570.
- Govindachari, T. R., Parthasarathy, P. C. (1971).** Cryptocaryalactone, a novel 5,6-dihydro-2-H-pyran-2-one from *Cryptocarya bourdillonii* Gamb. *Tetrahedron Letters*, 3401-3402.
- Govindachari, T. R., Parthasarathy, P.C., Modi, J.D. (1971).** Chemical investigation of *Cryptocarya bourdillonii* Gamb.: cryptocaryalactone, a new kawa - type lactone. *Indian J. Chem.* 10, 149-151.
- Hahlbrock, K., Ebel, J., Ortmann, R., Sutter, A., Wellmann, E., Grisebach, H. (1971).** Regulation of enzyme activities related to the biosynthesis of flavone glycosides in cell suspension cultures of Parsley (*Petroselinum hortense*). *Biochim. Biophys. Acta*, 7-15.
- Hahlbrock, K. (1972).** Malonyl coenzyme A. Flavone glycoside malonyl-transferase from illuminated cell suspension cultures of parsley. *FEBS Lett.* 28, 65-68.
- Hahlbrock, K., Schröder, J. (1975).** Light induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 47-53.
- Hänsel, R., Sauer, H., Rimpler, H. (1966).** 11-Methoxy-nor-yangonin aus einer botanisch nicht beschriebenen Piperart Neu - Guineas. *Archiv der Pharmazie* 299, 507-508.
- Hänsel, R., Beer, C., Schulz, J. (1973).** Ein neues Kawapyron aus *Piper sanctum*. *Chem. Ber.* 106, 3119-3126.
- Hänsel, R., Pelter, A., Schulz, J., Hille, C. (1976).** Ein 5-Acetoxy-6-methoxykawain aus *Piper sanctum* und Synthese beider Diastereomere. *Chem. Ber.* 109, 1617-1624.
- Hänsel, R. (1996).** Kava-Kava (*Piper methysticum* G. Forster) in der modernen Arzneimittelforschung. *Zeitschrift für Phytotherapie* 17, 180-194.
- Hänsel, R., Schulz, J. (1982).** *Archives of Pharmaceuticals* 315, 147.
- Harris, E., L., V., Angal, S., Hrsg.(1989).** Protein purification methods - a practical approach. In: *Proteins - Purification* Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Hasan, C. M., Mia, M. Y., Rashid, M. A., Conolly, J. D. (1994).** 5-Acetoxyisogoniotalamin oxide, an epoxystyryl-lactone from *Gonithalamus* species. *Fitoterapia* 66, 378.
- Hashimoto, F., Horigome, T., Kanabayashi, M., Yoshida, K., Sugano, H. (1983).** An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 129, 192-199.
- Hatfield, G. M., Brady, L. R. (1968).** Isolation of bisnoryangonin from *Gymnopilus decurrens*. *Lloydia* 31 (3), 225-228.
- Hatfield, G. M., Brady, L. R. (1969).** Occurrence of bis-noryangonin in *Gymnopilus spectabilis*. *J. Pharm. Sci.* 58 (10), 1298-1299.
- Hatfield, G. M. (1970).** Occurrence and biosynthesis of fungal styrylpyrones. University of Washington.
- Hatfield, G. M., Brady, L. R. (1971).** Occurrence of bisnoryangonin and hispidin in *Gymnopilus* species. *Lloydia* 34 (2), 260-263.
- Hatfield, G. M., Brady, L. R. (1973).** Biosynthesis of hispidin in cultures of *Polyporus schweinitzii*. *Lloydia* 36 (1), 59-65.
- Haucke, R. L. (1978).** A taxonomic monograph of *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Nova Hedwigia* 30, 385.
- Hauteville, M., Chopin, J., Geiger, H., Schuler, L. (1981).** Protogenkwanin, a new flavonoid from *Equisetum arvense* L. *Tetrahedron* 37 (2), 377-381.
- Hegnauer, R. (1989).** *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 633 - 664.
- Heitefuss, R. (2001).** Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften* 88, 273-283.
- Helariutta, Y., Kotilainen, M., Elomaa, P., Kalkkinen, N., Bremer, K., Teeri, T., H., Albert, V., A. (1996).** Duplication and functional divergence in the chalcone synthase gene family of Asteraceae: evolution with substrate change and catalytic simplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9033-9038.

- Heller, W., Hahlbrock, K. (1980).** Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone. Arch. Biochem. Biophys. 200 (2), 617-619.
- Heller, W., Forkmann, G. (1988).** Biosynthesis in Flavonoids. In: The Flavonoids, Harborne J. B., Hrsg., Chapman & Hall Ltd., London, 399-425.
- Heller, W., Forkmann, G. (1993).** Biosynthesis of Flavonoids. In: The Flavonoids: Advances in research since 1986, Harborne J. B., Hrsg., Chapman & Hall, London, 499-535.
- Herderich, M., Beckert, C., Veit, M. (1997).** Establishing styrylpyrone synthase activity in cell free extracts obtained from gametophytes of *Equisetum arvense* L. by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. Phytochem. Anal. 8, 198-197.
- Hillis, W. E., Hasegawa, M. (1962).** Chem. Ind., 1330-1331.
- Hinderer, W., Seitz, H. U. (1985).** Chalcone synthase from cell suspension cultures of *Daucus carota* L. Arch. Biochem. Biophys. 240 (1), 265-272.
- Hjerten, S. (1981).** Hydrophobic interaction chromatographie. Advances in Chromatography 19, 111-123.
- Hlubucek, J. R., Robertson, A. V. (1967).** (+)-(5S)-delta-Lactone of 5-hydroxy-7-phenylhepta-2,6-dienoic acid, a natural product from *Cryptocarya caloneura* (Scheff.). Australian J. Chem. 20, 2199-2206.
- Hohlfeld, M. (1998).** Strukturen, enzymatische Synthese und Metabolismus von Kaffeesäureestern in Gametophyten und Sporophyten von *Equisetum arvense* L. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Hohlfeld, M., Veit, M., Strack, D. (1996).** Hydroxycinnamoyltransferases involved in the accumulation of caffeic esters in gametophytes and sporophytes of *Equisetum arvense*. Plant Physiol. 111, 1153-1159.
- Holtzauer, M. (1988).** Biochemische Arbeitsmethoden: Arbeitsvorschriften und Tabellen. Springer, Berlin.
- Hösel, W. (1981).** Glycosylation and Glycosidases. In: The Biochemistry of Plants, Conn E. E., Hrsg., Academic Press, New York, 725-753.
- Hrazdina, G., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K., Grisebach, H. (1976).** Substrate specificity of flavanone synthase from cell suspension cultures of parsley and structure of release products in vitro. Arch. Biochem. Biophys. 175 (2), 392-399.
- Hrazdina, G., Wagner, G. J. (1985).** Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. Arch. Biochem. Biophys. 237 (1), 88-100.
- Hrazdina, G., Weeden, N. F. (1986).** Enzymic control of anthocyanin expression in the flowers of pea (*Pisum sativum*) mutants. Biochem. Genet 24 (3-4), 309-317.
- Hrazdina, G., Zobel, A. M., Hoch, H. C. (1987).** Biochemical, immunological, and immunocytochemical evidence for the association of chalcone synthase with endoplasmic reticulum membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8966-8970.
- Hrazdina, G., Zobel, A. M., Hoch, H. C. (1988).** Ultrastructural localization of chalcone synthase, a soluble flavonoid pathway enzyme by immunogold methods: association with ER membranes. Bull. Liaison, Groupe Polyphenols 14, 61-64.
- Hrazdina, G. (1992).** Plant polyphenols, Biosynthesis of flavonoids. Basic Life Sci. 59, 61-72.
- Hrazdina, G., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K., Grisebach, H. (1976).** Substrate specificity of flavanone synthase from cell suspension cultures of parsley and structure of release products in vitro. Arch. Biochem. Biophys. 175 (2), 392-399.
- Ibrahim, R. K., Towers, G.H.N. (1962).** Studies of hydrangenol in *Hydrangea macrophylla* Ser., II. Biosynthesis of hydrangenol from C14- labeled compounds. Can. J. Biochem. Physiol. 40, 449-456.
- Ishikura, N., Yamamoto, K. (1990).** Detection and characterization of UDP-glucose: Flavonoid O-Glycosyltransferases in the leaves of *Prunus yedoensis* Matsun. Plant Cell Physiol. 31, 1109-1113.

- Jahnen, W., Hahlbrock, K. (1988).** Differential regulation and tissue-specific distribution of enzymes of phenylpropanoid pathways in developing parsley seedlings. *Planta* 173 (4), 453-458.
- Jervis, L., Pierpoint, W. S. (1989).** Purification technologies for plant proteins. *J. Biotech.* 11, 161-198.
- Jewers, K., Davis, J. B., Douyan, J., Manchanda, A. H., Blunden, G., Ayekye-Welchapien, S. (1972).** Goniotalamin and its distribution in four *Goniotalamus* species. *Phytochemistry* 11, 2025-2034.
- Jez, J. M., Austin, M. B., Ferrer, J-L, Bowmann, M.,E., Schröder, J., Noel, J. P. (2000a).** Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chemistry & Biology* 7 (12), 919-930.
- Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowmann, M. E., Dixon, R.A., Noel, J. P. (2000b).** Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* 39, 890-902.
- Jez, J. M., Noel, J. P. (2000c).** Mechanism of Chalcone Synthase. *J. Biol. Chem.* 275 (50), 39640-39646.
- Junghanns, K. T., Kneusel, R. E., Baumert, A., Maier, W., Gröger, D., Matern, U. (1995).** Molecular cloning and heterologous expression of acridone synthase from elicited *Ruta graveolens* L. cell suspension cultures. *Plant Mol. Biol* 27, 681-692.
- Kato, Y. (1987).** High performance hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Adv. Chromatography* 26, 97-115.
- Keller, F., Klohs, M. W. (1963).** A review of the chemistry and pharmacology of the constituents of *Piper methysticum*. *Lloydia* 26 (1), 1-13.
- Kessler, A. (1991).** Untersuchungen über die Farbstoffe von *Pseudophaeolus baudonii* und Koaleszenzphänomene bei mono-acylierten 2,5-Dihydroxyterphenylchinonen. Universität Bonn.
- Kimura, Y., Takido, M., Nakano, K., Takashita, M. (1966).** Constituents of Alpinia plants. X. On the rhizoma of *A. speciosa* and *A. kumatahe*. *Yakugaku Zasshi* 86, 1184-1190.
- Kirk, T. K., Lorenz, L. F., Larsen, M. J. (1975).** Partial characterization of a phenolic pigment from sporocarps of *Phellinus igniarius*. *Phytochemistry* 14 (1), 281-284.
- Klaar, M., Steglich, W. (1977a).** Fungus pigments, XXVII. Isolation of hispidin and 3,14'-bihispidinyl from *Phellinus pomaceus* (Poriales). *Chem. Ber.* 110 (3), 1058-1062.
- Klaar, M., Steglich, W. (1977b).** Fungus pigments, XXVIII. Hymenoquinone, the red pigment of *Hymenochaete mougeotii* (Poriales). *Chem. Ber.* 110, 1063-1068.
- Knogge, W., Schmelzer, E., Weissenböck, G. (1986).** The role of chalcone synthase in the regulation of flavonoid biosynthesis in developing oat primary leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 250 (2), 364-372.
- Köster, J., Barz, W. (1981).** UDP-Glucose:Isoflavone 7-O-Glucosyltransferase from roots of chick pee (*Cicer arietinum*). *Arch. Biochem Biophys.* 22 (1), 98-104.
- Koundal, K. R., Sawhney, S. K., Sinha, S. K. (1983).** Oxidation of 2-Mercaptoethanol in the presence of tris buffer. *Phytochemistry* 22, 2183-2184.
- Kramer, K. U., Schneller, J.J., Wollenweber, E. (1995).** Farne und Farnverwandte. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Kreuzaler, F., Hahlbrock, K. (1972).** Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5, 7, 4'- trihydroxyflavanone) from *p*-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *FEBS Lett.* 28, 69-72.
- Kreuzaler, F., Hahlbrock, K. (1973).** Chalkon-Synthase aus belichteten Zellsuspensionskulturen von *Petroselinum hortense*. *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1214.
- Kreuzaler, F., Hahlbrock, K. (1975a).** Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem* 56 (1), 205-213.

- Kreuzaler, F., Hahlbrock, K. (1975b).** Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants. Formation of bisnoryangonin (4-hydroxy-6-[4-hydroxystyryl]-2-pyrone) from *p*-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA. Arch. Biochem. Biophys. 169 (1), 84-90.
- Kreuzaler, F., Hahlbrock, K. (1975c).** Enzymic synthesis of aromatic compounds in higher plants. Formation of bisnoryangonin (4-hydroxy-6-[4-hydroxystyryl]-2-pyrone) from *p*-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA. Arch. Biochem. Biophys. 169 (1), 84-90.
- Kreuzaler, F., Ragg, H., Heller, W., Tesch, R., Witt, I., Hammer, D., Hahlbrock, K. (1979).** Flavanone synthase from *Petroselinum hortense*. Molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA, and absence of pantetheinyl residue. Eur. J. Biochem. 99, 89-96.
- Kurosaki, F. (1995).** Dimer as the active form of a polyketide biosynthetic enzyme 6-hydroxymellein synthase. Phytochemistry 39 (3), 515-519.
- Kurosaki, F. (1996).** Effect of NADPH-associated keto-reducing domain on substrate entry into 6-hydroxymellein synthase, a multifunctional polyketide synthetic enzyme involved in phytoalexin biosynthesis in carrot. Arch. Biochem. Biophys. 328 (19), 213-217.
- Kurosaki, F., Arisawa, M. (1999).** Free CoA as activator of 6-hydroxymellein synthase, a multifunctional polyketide biosynthetic enzyme in carrot. Phytochemistry 50, 565-569.
- Lämmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lange, B. M., Trost, M., Heller, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr. (1994).** Elicitor-induced formation of free and cell-wall-bound stilbenes in cell-suspension cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris*). Planta 194 (19), 143-148.
- Lanz, T., Tropf, S., Marner, F. J., Schröder, J., Schröder, G. (1991a).** The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. J. Biol. Chem. 266 (15), 9971-9976.
- Lanz, T., Tropf, S., Marner, F. J., Schroeder, J., Schroeder, G. (1991b).** The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. J. Biol. Chem. 266 (15), 9971-9976.
- Leete, E., Muir, A., Towers, G. H. N. (1982).** Biosynthesis of psilotin from [2',3'-¹³C,2,1'-¹⁴C,4-³H] phenylalanine studied with carbon-13 NMR. Tetrahedron Lett 23 (26), 2635-2638.
- Legler, G. (1970).** Markierung des aktiven Zentrums der β -Glucosidasen A und B aus dem Süßmandel-Emulsin mit [3H]6-Brom-6-desoxy-condurit-B-epoxid. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 351, 25-31.
- Legler, G., Harder, A. (1978).** Amino acid sequence at the active site site of β -glucosidase A from bitter almonds. Biochim. Biophys. Acta 524, 102-108.
- Lewin, L. (1886).** Über *Piper methysticum* (Kava). August Hirschwald Berlin, 60.
- Logan, K. J., Thomas, B. A. (1985).** Distribution of lignin derivatives in plants. New Phytol. 99 (4), 571-585.
- Loomis, W. D. (1974).** Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. Methods in Enzymology 31, 528-548.
- Lukacin, R., Springob, K., Urbanke, C., Ernwein, C., Schröder, G., Schröder, J., Matern, U. (1999).** Native acridone synthases I and II from *Ruta graveolens* L. form homodimers. FEBS Lett. 448, 135-140.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, G. H. N. (1970).** The systematic identification of flavonoids. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Manger, M. C., Ollis, W. D. (1967).** I.O. Sutherland Chem. Commun., 577.
- Markham, K. R., Geiger, H. (1994).** H-nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosids in hexadeuterodimethylsulfoxide,. In: The flavonoids-Advances in research since 1986, Harborne J. B., Hrsg., Chapman&Hall,London,
- Mc Innes, A. G., Yoshida, S., Towers, G. H. N. (1965).** A phenolic glucoside from *Psilotum nudum* (L) Griseb. Tetrahedron 21, 2939 - 2946.

- Mc Intosh, C. A., Latchinian, L., Mansell, R. L. (1990).** Flavanone-specific 7-O-Glucosyltransferase activity in *Citrus paradisi* seedlings: purification and characterization. Arch. of Biochem. Biophys. 282 (1), 50-57.
- Meusel, W., Laroche, J., Hemmerling, J. (1971).** Die Schachtelhalme Europas. Neue Brehm Bücherei, Ziemsen Verlag, Wittenberg.
- Miller, P. C., Ng, E. (1977).** Root shoot biomass ratios in shrubs in southern California USA and central Chile. Madrono 24 (4), 215-223.
- Morita, H., Noguchi, H., Schröder, J., Abe, I. (2001).** Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase. Eur. J. Biochem. 268, 3759-3766.
- Mors, W. B., Magalhaes, M. T., Gottlieb, O. R. (1962).** Naturally occurring aromatic derivatives of monocyclic alpha-pyrone. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 20 (131), 132-164.
- Mortimer, C. E. (1987).** Chemie, Das Basiswissen der Chemie. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Motidome, M., Gottlieb, O. R., Kubitzki, K. (1982).** The chemistry of Brazilian Lauraceae. LXXI. Styrylpyrones of *Aniba panurensis* and *A. permollis*. Acta Amazonica 12 (3), 667-668.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.
- Nambudiri, A. M. D., Vance, C. P., Towers, G. H. N. (1973).** Effect of light on enzymes of phenylpropanoid metabolism and hispidin biosynthesis in *Polyporus hispidus*. Biochem. J. 134 (4), 891-897.
- Nambudiri, A. M. D., Vance, C. P., Towers, G. H. N. (1974).** Styrylpyrone biosynthesis in *Polyporus hispidus*. II. Enzymic hydroxylation of *p*-coumaric acid and bisnoryangonin. Biochim. Biophys. Acta 343 (1), 148-155.
- Nölting, E., Kopp, A. (1874).** Sur la racine de Kawa. Moniteur Scientifique, 902-923.
- O'Rorke, M. (1860).** Compt. rend 50, 598.
- Page, C. N. (1974).** *Equisetum* subgenus *Equisetum* in the Sino-Himalayan region- a preliminary taxonomic and evolutionary appraisal. Fern Gaz. 11, 25-47.
- Page, C. N. (1982).** An assesment of inter-specific relationships in *Equisetum* subgenus *Equisetum*. New Phytol 72, 355-369.
- Page, C. N., Barker, M. A. (1985).** Ecology and geography of hybridisation in British and Irish horsetails. Proc. Royal Soc. Edinburgh 86B, 265-272.
- Paulino Filho, H. F., Muradian, J., Mors, W. B. (1977).** Phytochemical study of *Acosmium subelegans* (Mohlenb.). Isolation and synthesis of 4-methoxy-6-(*p*-hydroxystyryl)-alpha-pyrone. Rev. Latinoam. Quim 8 (2), 79-81.
- Perrin, P. W. (1972).** Cinnamic acid pathway and hispidin biosynthesis in cultures of *Polyporus hispidus*. University of British Columbia.
- Perrin, P. W., Towers, G. H. N. (1973a).** Metabolism of aromatic acids by *Polyporus hispidus*. Phytochemistry, 583-587.
- Perrin, P. W., Towers, G. H. N. (1973b).** Hispidin biosynthesis in cultures of *Polyporus hispidus*. Phytochemistry 12 (3), 589-592.
- Peters, A., Schneider-Poetsch, H. A. W., Schwarz, H., Weissenböck, G. (1988).** Biochemical and immunological characterization of chalcone synthase from rye leaves. J. Plant Physiol. 133 (2), 178-182.
- Pierpoint, W. S. (1996).** The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. In: protein purification protocols, Doonan S., Hrsg., Humana Press Inc, Totowa, NJ,
- Pizzolatti, M. G., Luciano, C., Monache, F.D. (2000).** Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa*. Phytochemistry 55, 819-822.
- Poulton, J. E., Kauer, M. (1977).** Identification of an UDP-Glucose: Flavonol 3-O-Glucosyl-Transferase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.). Planta 136, 53-59.
- Power, D. M., Towers, G. H. N., Neish, A. C. (1965).** Biosynthesis of phenolic acids by certain wood-destroying basidiomycetes. Can. Journ. Biochem. 43, 1397-1407.

- Preisig-Mueller, R., Gnau, P., Kindl, H. (1995).** The inducible 9,10-dihydrophenanthrene pathway: characterization and expression of bibenzyl synthase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 317 (1), 201-207.
- Pryer, K. M., Schneider, H., Smith, A. R., Cranfill, R., Wolf, P. G., Hunt, J. S., Sipes, S. D. (2001).** Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature* 409, 618-621.
- Quisumbing, E. (1978).** Medical Plants of the Phillipines. JMC Press INC Bureau of Printing, Manila.
- Rodbard, D. (1970).** Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 65, 970-977.
- Rolfs, C. H., Kindl, H. (1984).** Stilbene synthase and chalcone synthase. Two different constitutive enzymes in cultured cells of *Picea excelsa*. *Plant Physiol* 75 (2), 489-492.
- Rommewinkel, M., Karwatzki, B., Beerhues, L., Wiermann, R. (1992).** Immunofluoreszenz localization of chalcone synthase in roots of *Pisum sativum* L., *Phaseolus vulgaris* L. and comparable immunochemical analysis of chalcone synthase from pear leaves. *Protoplasma* 166, 115-123.
- Rossi, M. H., Yoshida, M., Maia, J. G. S. (1997).** Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. *Phytochemistry* 45 (6), 1263-1269.
- Rupprich, N., Kindl, H. (1978).** Stilbene synthases and stilbenecarboxylate synthases. I. Enzymic synthesis of 3,5,4'-trihydroxystilbene from *p*-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem* 359 (2), 165-172.
- Rupprich, N., Hildebrand, H., Kindl, H. (1980).** Substrate specificity in vivo and in vitro in the formation of stilbenes. Biosynthesis of rhaponticin. *Arch. Biochem. Biophys.* 200 (1), 72-78.
- Saleh, N. A. M., Fritsch, H., Kreuzaler, F., Grisebach, H. (1978).** Flavanone synthase from cell suspension cultures of *Haplopappus gracilis* and Comparison with the synthase from parsley. *Phytochemistry* 17, 183-186.
- Saleh, N. A. M., Abdalla, M. F. (1980).** The flavonoids of *Equisetum ramosissimum*. *Phytochemistry* 19 (5), 9422-9431.
- Saleh, N. A. M., Fritsch, H., Witkop, P., Grisebach, H. (1976).** UDP-Glucose: Cyanidin 3-O-glucosyltransferase from cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Planta* 133, 41-45.
- Sam, T. W., Chew, S. Y., Sabirin, M., Gan, E. K., Dzulkifli, R., Mohamed, A. L. (1987).** Goniothalamine oxide: an embryotoxic compound from *Goniothalamus macrophyllus* (Annonaceae). *Tetrahedron Letters*, 2541-2544.
- Saslowsky, D., Winkel-Shirley, B. (2001).** Localization of flavonoid enzymes in Arabidopsis roots. *Plant* 27 (1), 37-48.
- Sauer, H., Hänsel, R. (1967).** Components of Piper species. XVI. Kava lactones and flavonoids from an endemic Piper species of New Guinea. *Planta Med.* 15 (4), 443-458.
- Schanz, S., Schröder, G., Schröder, J. (1992).** Stilbene synthase from scots pine (*Pinus sylvestris*). *FEBS Lett* 313 (1), 71-74.
- Schmidt, W., Beerhues, L. (1997).** Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *FEBS Lett.* 420, 143-146.
- Schöppner, A., Kindl, H. (1979).** Stilbene synthase (Pinosylvine synthase) and its introduction by ultraviolet light. *FEBS Lett.* 108, 349-352.
- Schöppner, A., Kindl, H. (1984).** Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *J. Biol. Chem.* 259, 6806-6811.
- Schraudner, M. (1992).** Frühe Reaktionen von Tabak und Buche auf Ozon: Induktion des Tyramin- und Polyaminstoffwechsels. Technische Universität München.
- Schröder, J., Heller, W., Hahlbrock, K. (1979).** Flavanone Synthase: simple and rapid assay for the key enzyme of flavonoid biosynthesis. *Plant Sci. Lett.* 14, 281-286.
- Schröder, J., Schröder, G. (1990).** Stilbene and chalcone synthases: related enzymes with key functions in plant - specific pathways. *Z. Naturforsch. Biosci* 45 C, 1-7.

- Schröder, J. (1997).** A family of plant - specific polyketide synthase: facts and predictions. *Trends in Plant Science* 2 (10), 373-378.
- Schröder, J. (1999).** Probing plant polyketide biosynthesis. *Nat. Struc. Biol.* 6 (8), 714-716.
- Schütz, R., Heller, W., Hahlbrock, K. (1983).** Substrate specificity of chalcone synthase from *Petroselinum hortense*. Formation of phloroglucinol derivatives from aliphatic substrates. *J. Biol. Chem.* 258 (11), 6730-6734.
- Shibata, T., Shibuya, T., Kozo, D. (1972).** The Occurrence of yangonin, 4-methoxy-6 (*p*-methoxystyryl)-2-pyrone in Ranunculaceae. *Bull. Chem. Soc. Japan* 45 (3), 930-931.
- Siegel, S. M. (1976).** Inhibitory activity of the phenolic glucoside psilotin and its reversal by gibberelic acid and thiols. *Phytochemistry* 15 (4), 566-567.
- Smith, R. M. (1983).** Kava lactones in *Piper methysticum* from Fiji. *Phytochemistry* 22 (4), 1055-1056.
- Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gafney, S.H., Goulding, P.N., Magnolato, D., Lilley, T.H., Haslam, E. (1988).** Polyphenol complexation - some thoughts and observations. *Phytochemistry* 27, 2397-2409.
- Spribile, R., Forkmann, G. (1982).** Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparations from flowers of *Dianthus caryophyllus* L. *Planta* 155 (2), 176-182.
- Stanley, S. M. (1994).** *Historische Geologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Steglich, W., Jendry, B. (1979).** Geogenin, ein neuartiger Pyronfarbstoff aus *Hydnellum geogenium*. *Sydowia Beiheft VIII*, 378.
- Steiner, G. (2000).** The correlation between cancer incidence and kava consumption. *Hawaii Med.* 59, 420-422.
- Stich, K., Forkmann, G. (1987).** Enzymic synthesis of 4'- and 3',4'-hydroxylated flavanones and flavones with flower extracts of *Sinningia cardinalis*. *Z. Naturforsch., C: Biosci* 42 (11-12), 1193-1199.
- Stich, K., Forkmann, G. (1988).** Studies on columnidin biosynthesis with flower extracts from *Columnea hybrida*. *Z. Naturforsch., C: Biosci* 43 (3-4), 311-314.
- Stöckigt, J., Zenk, M. H. (1975).** Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. *Z. Naturforsch. C: Biosci* 30c, 352-358.
- Stotz, G., Spribile, R., Forkmann, G. (1984).** Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena hybrida*. *Plant Physiol.* 116 (2), 173-183.
- Strack, D., Heilmann, J., Wray, V., Dirks, H. (1989).** Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from norway spruce needles. *Phytochemistry* 28 (8), 2071-2078.
- Strack, D., Gross, Wiltrud, Heilemann, Juergen, Keller, Harald, Ohm, Sabine (1988a).** Enzymic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of glucaric acid and hydroaromatic acids from the respective 1-O- hydroxycinnamoylglucoside and hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioester as acyl donors with a protein preparation from *Cestrum elegans* leaves. *Z. Naturforsch. C: Biosci* 43 (1-2), 32-36.
- Strack, D., Heilemann, J., Klinkott, E.-S. (1988b).** Cell wall bound phenolics from norway spruce (*Picea abies*) needles. *Z. Naturforsch.* 43 C, 37.
- Sütfield, R., Kehrel, B., Wiermann, R. (1978).** Characterization, development and localization of " flavanone synthase " in tulip anthers. *Z. Naturforsch.* 33 c, 841- 846.
- Sutter, A., Grisebach, H. (1973).** UDP-glucose: Flavonol 3-O-glucosyltransferase from cell suspension cultures of parsley. *Biochim. Biophys. Acta* 309, 289 -295.
- Sutter, A., Ortmann, R., Grisebach, H. (1972).** Purification and properties of an enzyme from cell suspension cultures of parsley catalyzing the transfer of D-glucose from UDP- D-glucose to flavonoids. *Biochim. Biophys. Acta* 258, 71-87.
- Takahashi, S., Nakamura, F., Sahashi, N., Ohmoto, T., Mizushima, U., Sankawa, U., Towers, G. H. N. (1990).** Chemical markers of the psilotaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 18, 11-12.

- Talapatra, B., Prahdan, D. K., Talapatra, S. K. (1976).** 4-Hydroxydehydrokawain, a new kawa pyrone from *Anaphalis adnata* DC. Indian J. Chem. 22, 300-301.
- Talapatra, S. K., Basu, D., Deb, T., Goswami, S., Talapatra, B. (1985a).** Structure and stereochemistry of four new 5,6 - dihydro - 2 - pyrones from *Goniothalamus sesquipedalis* and *Goniothalamus griffithii*. Indian J. Chem. 24 B, 29 - 34.
- Talapatra, S. K., Bose, S., Mallik, A. K., Talapatra, B. (1985b).** On the chemistry of indian orchidaceae plants 2. dengibsin and denfibsinin the 1st natural fluorenone derivatives from dendrobium-gibsonii. Tetrahedron 41, 2765-2769.
- Towers, G. H. N. (1969).** Metabolism of cinnamic acid and its derivatives in basidiomycetes. In: Perspectives in Phytochemistry, Harborne J. B., Swain, T., Hrsg., Academic Press, London, New York, 179-190.
- Towers, G. H. N., Vance, C. P., Nambudiri, A. M. D. (1974).** Photoregulation of phenylpropanoid and styrylpyrone biosynthesis in *Polyporus hispidus*. Recent Adv. Phytochem. 8, 81-94.
- Towers, G. H. N., WAT, C. K. (1979).** Phenylpropanoid metabolism. Plant. med. J. Med. Plant Res. 37, 97-114.
- Towers, G. H. N., Subbao-Rao, P.V. (1972).** Metabolism of cinnamic acid and its derivatives in basidiomycetes. In: Recent Advances in Phytochemistry, Runneckles V. C., Watkin, J.E., Hrsg. New York,
- Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schröder, J., Schröder, G. (1994).** Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. J. Mol. Evol. 38 (6), 610-618.
- Tropf, S., Kärcher, B., Schröder, G., Schröder, J. (1995).** Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones. J. Biol. Chem. 270, 7922-7928.
- Tse, A., Towers, G. H. N. (1967).** Occurrence of psilotin in *Tmesipteris*. Phytochemistry 6 (1), 149.
- Van der Meer, I. M., Brouwer, M., Spelt, C. E., Mol, J. N. M., Stuitje, A. R. (1992).** The TACPyAT repeats in the chalcone synthase promoter of *Petunia hybrida* act as a dominant negative cis-acting module in the control of organ-specific expression. Plant J. 2 (4), 525-535.
- Vance, C. P., Tregunna, E. B., Nambudiri, A. M. D., Towers, G. H. N. (1974).** Styrylpyrone biosynthesis in *Polyporus hispidus*. I. Action spectrum and photoregulation of pigment and enzyme formation. Biochim. Biophys. Acta 343 (1), 138-147.
- Veit, M. (1990).** Untersuchungen zur Biologie sowie Akkumulation und Analytik von Sekundärstoffen der Equiseten unter besonderer Berücksichtigung von *Equisetum arvense* L. Fakultät für Biologie, Universität Würzburg.
- Veit, M., Czygan, F. C., Geiger, H., Markham, K. R. (1990a).** Flavonoids in *Equisetum litorale*. Planta Medica 56 (6), 578-579.
- Veit, M., Geiger, H., Czygan, F. C., Markham, K. R. (1990b).** Malonylated flavone 5-O-glucosides in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. Phytochemistry 29 (8), 2555-2560.
- Veit, M., Czygan, F. C., Geiger, H. (1991a).** Seasonal and intraspecific variations in flavonoids of *Equisetum arvense*. In: 39th Annual congress on medicinal plant research, A3-A4.
- Veit, M., Strack, D., Czygan, F. C., Wray, V., Witte, L. (1991b).** Di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. Phytochemistry 30 (2), 527-529.
- Veit, M., Geiger, H., Strack, D., Czygan, F. C. (1992a).** Organ specific and developmental changes in the accumulation of phenolics in species of *Equisetum* subgenus *Equisetum*. Bull. Liaison Groupe Polyphenols 16 (Pt1), 186-189.
- Veit, M., Weidner, C., Strack, D., Wray, V., Witte, L., Czygan, F. C. (1992b).** The distribution of caffeic acid conjugates in the Equisetaceae and some ferns. Phytochemistry 31 (10), 3483-3485.

- Veit, M., Czygan, F. C., Witte, L., Markham, K. R., Geiger, H. (1993a).** New kaempferol glycosides from *Equisetum* species. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* 48 (10), 1398-1400.
- Veit, M., Geiger, H., Wray, V., Abou-Mandour, A., Rozdzinski, W., Witte, L., Strack, D., Czygan, F. C. (1993b).** Equisetumpyrone, a styrylpyrone glucoside in gametophytes from *Equisetum arvense*. *Phytochemistry* 32 (4), 1029-1032.
- Veit, M., Gimlinger, H. G. (1993).** Hydroxytimtsäuren und Derivate - Pflanzeninhaltsstoffe an der Nahtstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 133, 911-928.
- Veit, M. (1994).** Probleme bei der Bewertung pflanzlicher Diuretika. *Zeitschrift für Phytotherapie* 16, 331-341.
- Veit, M., Bauer, K., Beckert, C., Kast, B., Geiger, H., Czygan, F. C. (1995a).** Phenolic characters of British hybrid taxa in *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 23 (1), 79-87.
- Veit, M., Beckert, C., Höhne, C., Bauer, K., Geiger, H. (1995b).** Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry* 38 (4), 881-891.
- Veit, M., Geiger, H., Kast, B., Beckert, C., Horn, C., Markham, K. R., Wong, H., Czygan, F. C. (1995c).** Styrylpyrone glucosides from *Equisetum*. *Phytochemistry* 39 (4), 915-917.
- Weidner, C., Veit, M., Czygan, F. C. (1991).** Accumulation dynamics of caffeic acid conjugates in *Equisetum arvense*. *Planta Med* 2 (A37), 0032-0043.
- Welle, R., Grisebach, H. (1987).** Purification and properties of chalcone synthase from cell suspension cultures of soybean. *Z. Naturforsch., C: Biosci* 42 c (11-12), 1200-1206.
- Wieder, S., Pohl, J. (1998).** Kava Kava, Die Heilkraft des pazifischen Wunderpfeffers. Wilhelm Heyne Verlag, München.
- Wilson, K. (1994).** Chromatographic techniques. In: Principles and techniques of practical biochemistry, Wilson K., Walker, J. M., Hrsg., University Press, Cambridge,
- Wilson, M. L., Stewart, N., Rothwell, G. W., Hrsg. (1993).** Paleobotany and the evolution of plants. In: Cambridge University press,
- Wu, Y. C., Duh, C. Y., Chang, F. R., Chang, G. Y., Wang, S. K., Chang, J. J., McPhail, D. R., McPhail, A. T., et al. (1991).** The crystal structure and cytotoxicity of goniodiol-7-monoacetate from *Goniothalamus amuyon*. *J. Nat. Prod.* 54 (4), 1077-1081.
- Wu, Y. C., Chang, F. R., Duh, C. Y., Wang, S. K., Wu, T. S. (1992).** Cytotoxic styrylpyrones of *Goniothalamus amuyon*. *Phytochemistry* 31, 2851-2853.
- Wu, Y.-C., Chang, F.-R., Duh, C.-Y., Wang, S.-K., Wu, T. S. (1992).** Cytotoxic styrylpyrones of *Goniothalamus giganteus*. *J. Nat. Prod.* 52 (6), 1371-1376.
- Yarmush, M. L., Antonsen, K. (1980).** *Comprehensive Biotechnol.* 2, 489.
- Zellner, J. (1920).** Zur Chemie der höheren Pilze. Über *Lactarius rufus* Scopol., *Lactarius pallidus* Pers. und *Polyporus hispidus*. *Monatshefte für Chemie*, 443-447.
- Zenk, M. H. (1979).** Recent work on cinnamoyl CoA derivatives. *Recent Adv. Phytochemistry* 12, 139-176.
- Zopf, W. (1889).** Über Pilzfarbstoffe. *Botanische Zeitung*, 53 - 57.
- Zurbier, K. W. M., Fung, S. Y., Scheffer, J. J. C., Verpoorte, R. (1993).** Assay of chalcone synthase activity by high-performance liquid chromatography. *Phytochemistry* 34 (5), 1225-1229.
- Zurbier, K. W. M., Leser, J., Berger, T., Hofte, A.J.P., Schröder, G., Veerpoorte, R., Schröder, J. (1998).** 4-Hydroxy-2-pyrone formation by chalcone and stilbene synthase with nonphysiological substrates. *Phytochemistry* 49 (7), 1945-1951.

8 ANHANG

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis
Tabellen
Publikationsliste
Lebenslauf
Erklärung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2-1: <i>Equisetum arvense</i> L.: vegetativer Spross (links); fertile Sprosse mit kleineren vegetativen Sprossen in Topfkultur (rechts).	12
Abbildung 1.2-2: <i>Equisetum arvense</i> L.; fertile Sprosse mit endständigen, zapfenförmigen Sporophyllständen.	13
Abbildung 1.2-3: Rekonstruktionen von a) <i>Equisetites arenaceus</i> und b) <i>Neocalamites merianii</i> (aus (FRENTZEN 1934)).	14
Abbildung 1.2-4: Generationswechsel der Equiseten.	15
Abbildung 1.2-5: Hydroxymethylsäurederivate in <i>Equisetum</i> .	17
Abbildung 1.2-6: Flavonol- und Flavon Grundstruktur.	18
Abbildung 1.3-1: Grundstruktur der Styrylpyrone. normal: Styrylteil des Moleküls, fett: Pyronring des Moleküls.	20
Abbildung 1.3-2: Darstellung unterschiedlicher Styrylpyronstrukturen und ihre Modifikationen.	21
Abbildung 1.3-3: Strukturen verschiedener Styrylpyrondimere.	22
Abbildung 1.3-4: Styrylpyrone aus Pilzen: Hymenochinon (26), Leucohymenochinon (27), Hypholomin A (28), Hypholomin B (29), ein 3,3'-verknüpftes Dehydro-Dimer (30), ein 1,1-Distyrylpyrylethan (31), Geogenin (32).	24
Abbildung 1.3-5: Styrylpyrone aus Farnpflanzen.	25
Abbildung 1.3-6: Strukturformeln von den im Text erwähnten Styrylpyronen.	29
Abbildung 1.3-7: Nachgewiesene und postulierte Schritte der Biosynthese von Styrylpyronen in Pilzen.	32
Abbildung 1.3-8: Pflanzenspezifische Polyketidsynthese Reaktionen. BAS: Benzalacetonsynthase; APS: Arylpyronsynthase; SPS: Styrylpyronsynthase CHS Chalconsynthase; STS Stilbensynthase; 2PS: 2-Pyronsynthase; 6HMS: 6-Hydroxymelleinsynthase; ACS: Acridonsynthase; VPS: Valerophenonsynthase; BPS: Benzophenonsynthase. Die Anzahl der Pfeile entspricht der Anzahl der jeweils mit dem Startermolekül verknüpften Malonyl-CoA Molekülen.	38
Abbildung 2.5-1: Reaktionsschema der Hydroxycinnamoyl-CoA Ester Synthese nach ZENK (ZENK 1979).	62
Abbildung 3.1-1: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes aus Rhizomen von <i>Equisetum arvense</i> L.	87
Abbildung 3.1-2: Tautomerisierung von Styrylpyronen.	92
Abbildung 3.1-3: $^1\text{J}^2\text{D}-^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -heterokorreliertes NMR-Spektrum der in Mischung vorliegenden Komponenten 1(a) und 2 (b).	92
Abbildung 3.1-4: Ausschnitt aus dem $^3\text{J}^2\text{D}-^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -heterokorrelierten NMR-Spektrum der in Mischung vorliegenden Komponenten 1(a) und 2 (b). Beispielhaft sind die Korrelationen von H-5 zu C-3 und C-8' sowie von H-2',6' (a) zu C-2'6' (a) eingezeichnet.	93
Abbildung 3.1-5: Ausschnitt aus dem $^3\text{J}^2\text{D}-^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -heterokorrelierten NMR-Spektrum der in Mischung vorliegenden Komponenten 1 (a) und 2 (b). Die starke Korrelation der Methylprotonen zu 4' (b) ist deutlich sichtbar und belegt die Methylierung der OH-Gruppe in Position 4 in der Komponente 2.	94
Abbildung 3.1-6: FAB-Massenspektrum (negativ) von 3'-Desoxyequisetumpyron (36); M=Molekülpeak, Matrixfragmente: G = Glycerin.	95
Abbildung 3.1-7: FAB-Massenspektrum (negativ) von <i>p</i> -Methoxyequisetumpyron (39); M = Molekülpeak, Matrixfragmente: G = Glycerin.	95
Abbildung 3.1-8: NMR- und MS-Spektren von Komponente Pyron 12. A Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum; FAB-Massenspektren, B positiv, C negativ; vergleiche auch Tabelle 3.1-5 und Abbildung 3.1-9.	98
Abbildung 3.1-9: Mögliche Struktur der Komponente Pyron 12, mit Darstellung des vermuteten Fragmentes $m/z = 325$ des FAB-MS-Spektrums (negativ); siehe auch Abbildung 3.1-8.	99

Abbildung 3.2-1: Relative Anteile [%] von Styrylpyronen am Pyrongesamtgehalt in Rhizomen von <i>Equisetum arvense</i> L. zu verschiedenen Erntezeitpunkten des Jahres 1994; EP = Equisetumpyron.	102
Abbildung 3.2-2: Absolute Gehalte [%TG] von Styrylpyronen und Hydroxyzimtsäurederivaten in Rhizomen von <i>Equisetum arvense</i> L. zu verschiedenen Erntezeitpunkten des Jahres 1994; DKMWS = Dikaffeoyl- <i>meso</i> -weinsäure.	102
Abbildung 3.2-3: Relative Anteile [%] einzelner Styrylpyronderivate am Pyrongesamtgehalt in Rhizomen verschiedener Arten des Subgenus <i>Equisetum</i> (vgl. Tabelle 7.1-2 und 7.1-3 im Anhang).	106
Abbildung 3.2-4: Absolute Gehalte [% TG] einzelner Styrylpyronderivate in Rhizomen verschiedener Arten des Subgenus (vgl. Tabelle 7.1-2 und 7.1-3 im Anhang); Legende siehe Abbildung 3.2-3.	106
Abbildung 3.2-5: Relative Anteile [%] von Styrylpyronen und Hydroxyzimtsäure-derivaten am Gesamtphenolgehalt verschiedener Arten des Subgenus <i>Equisetum</i>	108
Abbildung 3.2-6: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus Rhizomen von <i>Equisetum arvense</i> L.. Die Peaknumerierung bezieht sich auf Tabelle 7.1-1 im Anhang. Detektion 330 nm; IS = Innerer Standard.	108
Abbildung 3.2-7: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus Rhizomen von <i>Equisetum sylvaticum</i> L.. Die Peaknumerierung bezieht sich auf Tabelle 7.1-1 im Anhang. Detektion 330 nm; IS = Innerer Standard.	109
Abbildung 3.2-8: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus Rhizomen von <i>Equisetum pratense</i> EHRH.. Die Peaknumerierung bezieht sich auf Tabelle 7.1-1 im Anhang. Detektion 330 nm; IS = Innerer Standard.	109
Abbildung 3.2-9: Untersuchung einzelner Internodien des Sprossabschnittes im Übergangsbereich zwischen Rhizom und oberirdischem Spross. Darstellung (Fotokopie) eines Sprosses von <i>Equisetum arvense</i> L. mit Angabe der untersuchten Internodien und Organe; G = Gesamtspross; R = Gesamtrhizom.	113
Abbildung 3.2-10: Relative Gehalte [%] der phenolischen Stoffgruppen einzelner Internodien bezogen auf den Gesamtphenolgehalt.	114
Abbildung 3.2-11: Sterile Sprosse von <i>Equisetum arvense</i> L. mit charakteristischen Gewebeverbräunungen.	114
Abbildung 3.2-12: Querschnitt durch einen Spross von <i>Equisetum arvense</i> L. im Bereich einer Verbräunung bei Durchlichtbetrachtung im Hellfeld (Ortholux II).	115
Abbildung 3.2-13: Querschnitt durch einen Spross von <i>Equisetum arvense</i> L. im Bereich einer Verbräunung bei Durchlichtbetrachtung im Hellfeld (OrtholuxII).	116
Abbildung 3.2-14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Schnittes von Abbildung 3.2-13 nach Anregung mit 450-490 nm; Emission > 515 nm (konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, Ortholux II).	116
Abbildung 3.2-15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Querschnittes durch einen Spross von <i>Equisetum arvense</i> L. im Bereich einer Verbräunung nach Anregung mit 340-380 nm; Emission 430 nm (konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, Ortholux II).	117
Abbildung 3.2-16: Inhaltsstoffanalyse dunkelpigmentierter Gewebeabschnitte steriler oberirdischer Triebe von <i>Equisetum arvense</i> L.. A: Schematische Darstellung der Trennung von Sprosssegmenten mit verbräunten Gewebebereichen in einzelne Abschnitte; B: Relative Anteile phenolischer Stoffgruppen am Gesamtphenolgehalt in den einzelnen Abschnitten.	118
Abbildung 3.2-17: MS-Spektrum des Styrylpyronderivates aus dem sauren Hydrolysat der Extraktion zellwandgebundener Phenole.	119
Abbildung 3.2-18: Mögliche Fragmentierung des vermuteten Hispidin-Dimers bei HPLC-MS-MS Analyse.	119
Abbildung 3.3-1: Fluoreszenzspektren von A Dikaffeoyl- <i>meso</i> -weinsäure (DKMWS) und B Equisetumpyron (EP) in verschiedenen Lösungsmitteln nach Anregung mit 365 nm (siehe auch Tabelle 3.3-1). Für die graphische Darstellung der Spektren wurde die Fluoreszenzintensität proportional zur eingestellten Konzentration umgerechnet.	121

Abbildung 3.3-2: Vergleich der Fluoreszenzspektren von Dikaffeoyl- <i>meso</i> -weinsäure (DKMWS) und Equisetumpyron (EP) in drei Lösungsmitteln bei den Anregungswellenlängen 365 nm und 488 nm. Dikaffeoyl- <i>meso</i> -weinsäure zeigte bei Anregung mit 488 nm keine Fluoreszenz (siehe Tabelle 3.3-1). Für die graphische Darstellung der Spektren wurde die Fluoreszenzintensität proportional zur eingestellten Konzentration umgerechnet.	122
Abbildung 3.3-3: Vergleich von Fluoreszenzspektren der Reinsubstanzen und einzelner Emissionsbereiche der Fluoreszenzmikroskope. Dargestellt sind die Fluoreszenzspektren von Dikaffeoyl- <i>meso</i> -weinsäure und Equisetumpyron in den Lösungsmitteln Wasser und 50 % PEG 400 bei Anregung mit 365 nm. Die bei gleicher Anregungswellenlänge (bzw. Bereich) bei den jeweiligen Fluoreszenzmikroskopen verwendeten Bandpassfilter sind als „Kasten“ schematisch zusätzlich abgebildet. Die Lage der Spektren und die der Emissionsbereiche geben an, welche der zugehörigen Stoffgruppen bei gleicher Anregung im mikroskopischen Präparat in diesen Emissionsbereichen stärker fluoreszieren.	125
Abbildung 3.3-4: Vergleich des Absorptionsspektrums von Equisetumpyron mit dem Fluoreszenzspektrum von Dikaffeoyl- <i>meso</i> -weinsäure in Wasser. Der Wellenlängenbereich der Fluoreszenz der Säure liegt teilweise im Absorptionsbereich des Styrylpyrons.....	127
Abbildung 3.3-5: Querschnitt durch ein Rhizom von <i>Equisetum arvense</i> L. bei Durchlichtbetrachtung und konventioneller Fluoreszenzanregung. Direkte fotografische Aufnahmen (Ortholux II). Anregung 340-380 nm; Emission >430 nm.	129
Abbildung 3.3-6: Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Rhizomquerschnitte von <i>Equisetum arvense</i> L.. Vergleich unterschiedlicher Einbettungsmedien und Präparationstechniken. 1 Frischpräparat (Handschnitt), Wasser 2 Frischpräparat (Handschnitt), 50 % PEG 400 3 Dauerpräparat (Dünnschnitt), Harzeinbettung Bilderzeugung mit LSM, gemeinsame Darstellung der beiden Emissionsbereiche durch die Farben rot und grün.	134
Abbildung 3.3-7: Verteilungsmuster der Lichtemission in einem Rhizom-querschnitt von <i>Equisetum arvense</i> L. (Frischpräparat, Wasser) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Bilderzeugung mit LSM.....	135
Abbildung 3.3-8: Verteilungsmuster der Lichtemission in einem Querschnitt durch den Apikalbereich eines Rhizoms von <i>Equisetum arvense</i> L. (Dauerpräparat, Harzeinbettung) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Bilderzeugung mit LSM.	136
Abbildung 3.3-9: Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen von Rhizomquerschnitten der Arten <i>Equisetum arvense</i> L. (1) und <i>Equisetum sylvaticum</i> L. (2) (Frisch-präparate, 50 % PEG 400). Bilderzeugung mit konventioneller Fluoreszenz-mikroskopie. Gemeinsame Darstellung der drei Emissionsbereiche durch die Farben blau, grün und rot.	137
Abbildung 3.3-10: Verteilungsmuster der Lichtemission eines Rhizomquer-schnittes von <i>Equisetum sylvaticum</i> L. (Frischpräparat, 50 % PEG 400) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängenbereichen. Bilderzeugung mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie.	138
Abbildung 3.3-11: Querschnitt (1) und Längsschnitt (2) durch ein Rhizom von <i>Equisetum arvense</i> L. (Frischpräparate, 50 % PEG 400). Bilderzeugung mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie. Gemeinsame Darstellung der Emissionsbereiche durch die Farben rot, grün und blau.....	139
Abbildung 3.3-12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rhizom-querschnittes von <i>Equisetum arvense</i> L. (Wasser) nach Extraktion und Alkalibehandlung. Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie.	139
Abbildung 3.3-13: Längsschnitte durch ein Rhizom von <i>Equisetum arvense</i> L.. Frischpräparate in 50 % PEG 400 (1) und nach Plasmolyse mit 1 M NaCl (2a, 2b und 2c).	140
Abbildung 3.3-14: Prothallien-gewebe von <i>Equisetum arvense</i> L. (Frischpräparat, Wasser) nach Plasmolyse mit 1 M NaCl. In Aufnahme (3) ist eine Einzelzelle vergrößert	

dargestellt (siehe Kasten in (1)). Aufnahmen (1) und (2) sind wegen Verschiebung des Objektes zwischen den Aufnahmen nicht deckungsgleich. Bilderzeugung mit LSM. ...	141
Abbildung 3.3-15: Dünnschnitte (Dauerpräparate, Harzeinbettung) durch Prothallien-gewebe von <i>Equisetum arvense</i> L. (A: Antheridium). Bilderzeugung mit LSM.	
Aufnahmeparameter:	142
Abbildung 3.5-1: Biosynthesewege im Styrylpyronstoffwechsel.	147
Abbildung 3.5-2: Massenspektrum von Bisnoryangonin	148
Abbildung 3.5-3: Massenspektrum von Hispidin.	148
Abbildung 3.5-4: Chromatogramm des <i>In-vitro</i> -Enzymtests, Kaffeoyl-CoA und Malonyl-CoA inkubiert mit Gametophytenprotein-extrakt. NPK 1,2: Nebenproduktkomponenten, UP 1: Unbekanntes Produkt.....	149
Abbildung 3.5-5: Chromatogramm des Kontrollansatzes: Kaffeoyl-CoA inkubiert mit Gametophytenprotein-extrakt. NPK 1,2: Nebenproduktkomponenten.....	149
Abbildung 3.5-6: Chromatogramm des Kontrollansatzes: Malonyl-CoA und Kaffeoyl-CoA inkubiert mit hitzedenaturiertem Protein. Malonyl-CoA wird bei 370 nm nicht detektiert. VRK: Verunreinigung der Kaffeoyl-CoA Charge.	150
Abbildung 3.5-7: Chromatogramm des <i>In-vitro</i> -Enzymtests, <i>p</i> -Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA inkubiert mit Gametophytenproteinextrakt. NPC 1, 2, 3: Nebenproduktkomponenten.....	150
Abbildung 3.5-8: Chromatogramm des Kontrollansatzes: <i>p</i> -Cumaroyl-CoA inkubiert mit Gametophytenproteinextrakt. NPC 1,2: Nebenproduktkomponenten.....	151
Abbildung 3.5-9: Chromatogramm des Kontrollansatzes: Malonyl-CoA und <i>p</i> -Cumaroyl-CoA inkubiert mit hitze-denaturiertem Protein. Malonyl-CoA wird bei 370 nm nicht detektiert. VRpC: Verunreinigung der <i>p</i> -Cumaroyl-CoA Charge.	151
Abbildung 3.5-10: a) Dünnschichtchromatographisches Bild der <i>in-vitro</i> -Enzymtests, der Kontrollansätze und der Referenzsubstanz Hispidin.	152
Abbildung 3.5-11: Chromatogramm des <i>in-vitro</i> -Enzymtests mit Gametophytenproteinrohextrakt (35-75 % Ammoniumsulfatfällung). ABPH: Abbauprodukt des Hispidin; UP 3,4,5,6,7: Unbekannte Produktkomponenten mit Pyron <i>on-line</i> UV-Spektren.....	153
Abbildung 3.5-12: Chromatogramm des <i>in-vitro</i> -Enzymtests mit Protein-rohextrat (40-65 % Ammoniumsulfatfällung). ABPH: Abbauprodukt des Hispidin.....	153
Abbildung 3.5-13: Chromatogramm des Kontrollansatzes mit hitze-denaturiertem Enzym.	154
Abbildung 3.5-14: Chromatogramm des <i>in-vitro</i> -Enzymtest mit Rhizomproteinextrakten von <i>Equisetum arvense</i> L mit <i>p</i> -Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA als zugesetzten Substraten. NPC 1,2, 3: Nebenproduktkomponenten.....	154
Abbildung 3.5-15: Einfluss von Polyklar AT, Natriumascorbat und den SH-Schutzreagentien Mercaptoethanol und DTT auf die Aktivität der Styrylpyronsynthase. In die jeweiligen Abbildungen gingen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (s) aus parallelen Wiederholungsexperimenten ein. Die Anzahl der Experimente kann aus Tabelle 3.5-5 entnommen werden.	159
Abbildung 3.5-16 : Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung. Bildung von Hispidin \blacklozenge und Bisnoryangonin \blacktriangle im Vergleich. Jeder Messwert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung.	160
Abbildung 3.6-1: pH-Wert Abhängigkeit der SPS-Aktivität. Darstellung der spezifischen Aktivität in unterschiedlichen Puffersystemen, die zur Bildung von Bisnoryangonin mit <i>p</i> -Cumaroyl-CoA als zweitem Substrat führten (n = 3; \pm s).	167
Abbildung 3.6-2: pH-Wert Abhängigkeit der SPS-Aktivität. Darstellung der spezifischen Aktivität in KP _i -Puffer, die zur Bildung von Hispidin mit Kaffeoyl-CoA als zweitem Substrat führt (n = 3; \pm s).	168
Abbildung 3.6-3: Temperaturabhängigkeit der Styrylpyronsynthase, Bildung von Hispidin in KP _i -Puffer, pH 6,8 (n = 3; \pm s).	169
Abbildung 3.6-4: Temperaturabhängigkeit der Styrylpyronsynthase, Bildung von Bisnoryangonin in K-P _i -Puffer, pH 7,5 (n = 3; \pm s).....	169

Abbildung 3.6-5: Arrhenius-Auftragung zur Ermittlung der empirischen Aktivierungsenergie E_a mit $-E_a = \frac{\Delta \ln V}{\Delta T^{-1}} = 8,32 \frac{-0,60}{10^{-4}} = -50 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ für die Umsetzung von Malonyl-CoA mit Kaffeoil-CoA ($n = 3; \pm s$).....	170
Abbildung 3.6-6: Arrhenius-Auftragung zur Ermittlung der empirischen Aktivierungsenergie E_a bei der Umsetzung von Malonyl-CoA und <i>p</i> -Cumaroyl-CoA: $-E_a = \frac{\Delta \ln V}{\Delta T^{-1}} = 8,32 \frac{-0,59}{10^{-4}} = -49 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ in K-P _i Puffer ($n = 3; \pm s$).....	171
Abbildung 3.6-7: Zeitabhängigkeit der SPS, im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-ester: Kaffeoil-CoA. ($n = 3; \pm s$).....	172
Abbildung 3.6-8: Proteinabhängigkeit der SPS. Die Versuche wurden mit Proteinextrakten aus einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von 35-70% durchgeführt ($n = 3; \pm s$). Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-ester: Kaffeoil-CoA.	172
Abbildung 3.6-9: Proteinabhängigkeit der SPS. Die Versuche wurden mit Proteinextrakten aus einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von 30-65% durchgeführt ($n = 3; \pm s$). Im Test eingesetzter Hydroxycinnamoyl-ester: Kaffeoil-CoA.	173
Abbildung 3.6-10: Einfluss von Natriumascorbat, DTT, Mercaptoethanol und BSA auf die enzymatische Aktivität der SPS im <i>in-vitro</i> -Enzymtest. Der Abbildung liegen die Bestimmung der Mittelwerte aus jeweils drei Parallelversuchen zugrunde ($n = 3; \pm s$).	175
Abbildung 3.6-11: Kaffeoil-CoA-Abhängigkeit der SPS-Aktivität bei fester Malonyl-CoA-Konzentration von 1 mM. A) Michaelis-Menten-Kurve, B) Linearisierung der oben dargestellten Sättigungskurve nach Hanes. Der K_m ist als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesbar. C) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Der K_m ist der reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse.	177
Abbildung 3.6-12: Malonyl-CoA-Abhängigkeit der SPS-Aktivität bei fester Kaffeoil-CoA-Konzentration von 400 μM . A) Michaelis-Menten-Kurve, B) Linearisierung der oben dargestellten Sättigungskurve nach Hanes. Der K_m ist als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesbar. C) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Der K_m ist der reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse.	178
Abbildung 3.6-13: Malonyl-CoA-Abhängigkeit der SPS-Aktivität bei fester <i>p</i> -Cumaroyl-CoA-Konzentration von 400 μM . A) Michaelis-Menten-Kurve, B) Linearisierung der oben dargestellten Sättigungskurve nach Hanes. Der K_m ist als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesbar. C) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Der K_m ist der reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse.	179
Abbildung 3.6-14: <i>p</i> -Cumaroyl-CoA-Abhängigkeit der SPS-Aktivität bei fester Malonyl-CoA-Konzentration von 1 mM. A) Michaelis-Menten-Kurve, B) Linearisierung der oben dargestellten Sättigungskurve nach Hanes. Der K_m ist als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesbar. C) Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Der K_m ist der reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse.	180
Abbildung 3.6-15: Molekulargewichtsbestimmung der SPS durch Gelfiltration an Sephacryl S-200. Die Eichproteine sind Aldolase (a), Albumin (b), Ovalbumin (c) und Chymotrypsinogen (d) (vergleiche Tabelle 3.6-8). Lineare Regression ($y = ax+b$): $r^2 = 0,985$; $a = 1,34$; $b = -0,249$	182
Abbildung 3.6-16: Molekulargewichtsbestimmung der SPS durch Gelfiltration an Superose 12 HR. Die Eichproteine sind Ferritin (a), Katalase (b), Aldolase (c), Ovalbumin (d) und Chymotrypsinogen (e) (vergleiche Tabelle 3.6-8). Lineare Regression ($y = ax+b$): $r^2 = 0,945$; $a = 7,04$; $b = -2,252$	182
Abbildung 3.7-1: Verteilung der SPS-Aktivität in den Fraktionen der Gelpermeationschromatographie an Superose 12/HR [®]	184
Abbildung 3.7-2: Gelelektrophoretische Kontrolle des Reinigungserfolgs der SPS nach den einzelnen Reinigungsschritten. SDS-PAGE der SPS Präparationen (Silberfärbung) Spur (1): 40-65 % Ammoniumsulfatfraktion, Spur (2): Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose FF, Spur (3): 1. HIC an Alkyl Superose (vereinigte Fraktionen), Spur (4): HIC an Alkyl Superose (vereinigte Fraktionen), Spur (5): Gelfiltration an Superose	

12HR [®] (RS 2), Spur (6) und (7): Gelfiltration an Superose 12HR [®] nach HIC-Alkyl Superose, (M) Molekulargewichtsmarker, Spur (8): Probenpuffer.....	185
Abbildung 3.7-3: Verteilung der SPS-Aktivität in den Fraktionen der Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S-200 mit Proteinfraction RS2. : vereinigte Fraktionen des Eluates (Fraktion 35-41).	186
Abbildung 3.7-4: Vorstellung der Proteinbindung an Hydroxylapatit. A: Basisches Protein, B: Saures Protein; ((= Abstoßungskräfte, ···· = Ionische Bindung, ► = Wechselwirkungen aufgrund gegenseitiger Ladung; nach BIORAD. US/EG Bulletin 2156.	187
Abbildung 3.7-5: Verteilung der SPS-Aktivität nach Chromatographie an Hydroxylapatit (CALBIOCHEM).	188
Abbildung 3.7-6: Verteilung der SPS-Aktivität in den Fraktionen der Chromatographie an Alkylsepharose., vereinigte Fraktionen: Fraktion 39-45 und Fraktionen 49-52.	191
Abbildung 3.7-7: Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose FF (Reinigungsstufe 3). Die Proteinelution wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt.....	196
Abbildung 3.7-8: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butylsepharose Die Proteinelution wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt.	197
Abbildung 3.7-9: Hydrophobe Interaktionschromatographie an RESOURCE Isopropyl. Es wurden 0,5 mL Fraktionen gesammelt, deren Proteingehalt bestimmt und auf SPS-Aktivität getestet.....	199
Abbildung 3.7-10: SDS-PAGE der SPS-Präparation nach den einzelnen Reinigungsstufen (Silberfärbung). (1) Rohextrakt, (2) Molekulargewichtsmarker (3) Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE Sepharose FF [®] (4) HIC an Butylsepharose, Fraktion 78, (5) HIC an Butylsepharose Gesamtpool (6) HIC an RESOURCE Iso [®] Gesamtpool (7) (8) (9) HIC an RESOURCE Iso [®] Präparation der aktiven Fraktion in unterschiedlichen Konzentrationen, (M) Molekulargewichtsmarker.	201
Abbildung 3.8-1: Möglicher Biosyntheseweg zur Bildung des Equisetumpyrons über Kaffeoyl-CoA. A: Styrylpyronsynthase; B: 3-Hydroxylase; C: Glucosyltransferase; D: β -Glucosidase.	202
Abbildung 3.8-2: HPLC-Chromatogramm des Ansatzes zum Nachweis der Bildung von Equisetumpyron im <i>in-vitro</i> Enzymtest.	204
Abbildung 3.8-3: Chromatogramm des Kontrollansatzes zum Nachweis der Bildung von Equisetumpyron im <i>in-vitro</i> Enzymtest.	204

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.2-1: Verteilung der sekundären Inhaltsstoffe Flavonoide, Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate (HVS-Derivate) in verschiedenen Organen/Entwicklungsstufen von <i>Equisetum arvense</i>	18
Tabelle 1.3-1: Auflistung einiger Charakteristika wie Kristallform und Farbe, Schmelzpunkt und Absorptionsmaxima verschiedener Styrylpyrone.....	20
Tabelle 2.1-1: Untersuchte Arten und Hybriden.....	45
Tabelle 2.3-1: Bestandteiles Nährmediums MS nach MURASHIGE 1962	49
Tabelle 2.4-1: Präparation gereinigter Zellwände.....	51
Tabelle 2.4-2: Reaktionsansätze zur Extraktion zellwandgebundener Stoffe.....	51
Tabelle 2.4-3: Herstellung von Dauerpräparaten für die Mikroskopie.....	55
Tabelle 2.4-4: Fluoreszenzmikroskopische Techniken mit den jeweils verwendeten Anregungs- und Emissionsbereichen.....	56
Tabelle 2.4-5: Übersicht der durchgeführten Trennschritte zur Isolierung von P4, P2 P12 und Equisetumpyron.....	57
Tabelle 2.5-1: Absorptionsmaxima der synthetisierten CoA-Ester, Angaben nach ZENK 1979	64
Tabelle 2.8-1: Gewählte Bedingungen zur Abschätzung der SPS Stabilität.....	75
Tabelle 2.8-2: Zusammenstellung der gewählten Inkubationsbedingungen zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit.....	76
Tabelle 2.8-3: Eingesetzte Konzentrationen im Standardtest von BSA, DTT, β -Mercaptoethanol und Natriumascorbat.....	77
Tabelle 3.1-1: Chemische Verschiebungen [ppm] von Equisetumpyron in $(CD_3)_2SO$ in Abhängigkeit von der Lagerzeit der Probe bei 10°C.....	89
Tabelle 3.1-2: 1H , ^{13}C -NMR-Daten von 3-Desoxy-Equisetumpyron, 5,6-Dehydrokawain und <i>p</i> -Cumarsäure.....	90
Tabelle 3.1-3: 1H und ^{13}C -NMR-Daten von 4-Methoxy-Equisetumpyron, Equisetumpyron, 4-Methoxyhispidin und Hispidin.....	91
Tabelle 3.1-4: Vergleich der chemischen Verschiebungen δ [ppm] von Equisetumpyron in verschiedenen Lösungsmitteln.....	97
Tabelle 3.1-5: FAB-MS-Fragmente von Pyron 12 in Glycerolmatrix	99
Tabelle 3.2-1: Durchschnittliche Gehalte phenolischer Komponenten in Rhizomen von <i>Equisetum arvense</i> L.....	103
Tabelle 3.2-2: Vergleich der absoluten und relativen Gehalte von Styrylpyronen und Hydroxyzimtsäurederivaten in verschiedenen Geweben zweier Pflanzen von <i>Equisetum arvense</i> L.....	105
Tabelle 3.2-3: Hydroxyzimtsäurederivate in Rhizomen verschiedener Arten des Subgenus Equisetum.....	110
Tabelle 3.2-4: Phenolische Komponenten in Rhizomen verschiedener Hybriden des Subgenus Equisetum.....	111
Tabelle 3.3-1: Fluoreszenzspektroskopische Daten von Equisetumpyron und Dikaffeoyl- <i>meso</i> -weinsäure in verschiedenen Lösungsmitteln.....	123
Tabelle 3.3-2: Aufnahmeparameter beider fluoreszenzmikroskopischer Techniken am Axiovert-100 mit Angabe der jeweiligen Bildschirmkanäle für Farbdarstellungen.....	128
Tabelle 3.4-1: Detektierte Styrylpyrone und Hydroxyzimtsäurederivate in Prothallen (Proth.) und Rhizomen (Rhiz.) verschiedener Arten im Subgenus Equisetum.....	144
Tabelle 3.4-2: Absolute und relative Gehalte von Styrylpyronen und Hydroxyzimtsäurederivaten in Prothallen (Proth) und Rhizomen (Rhiz) verschiedener Arten des Subgenus Equisetum.....	145
Tabelle 3.5-1: Detektion von Hispidin in verschiedenen Puffern mit unterschiedlicher pH-Werten.....	152
Tabelle 3.5-2: Ergebnisse der einzelnen Schritte bei der Extraktion der Styrylpyronsynthese.....	156

Tabelle 3.5-3: Ergebnisse der wiederholten Extraktion des Rohextraktes mit Polyclar AT (50% w/V).....	157
Tabelle 3.5-4: Einfluß von Polyclar AT auf die Aktivität der SPS.	157
Tabelle 3.5-5: Auswirkung von unterschiedlicher Chinonfallen im Extraktionspuffer auf die Aktivität der SPS.....	158
Tabelle 3.5-6: Auswirkung unterschiedlicher Sättigungsbereiche an (NH ₄) ₂ SO ₄ auf die SPS-Aktivität.....	161
Tabelle 3.5-7: Wiederfindung der eingesetzten Hispidinmenge bei verschiedenen Aufarbeitungsarten der <i>in-vitro</i> Enzymtestansätze.	162
Tabelle 3.6-1: Stabilität der SPS nach 1, 2 und 4 Monaten nach Lagerung bei –80 °C mit Glycerinzusatz 10 % und ohne Glycerinzusatz.....	163
Tabelle 3.6-2: Stabilität der SPS nach 24-stündiger Lagerung bei –20 °C mit und ohne Glycerinzusatz.....	163
Tabelle 3.6-3: Stabilitätsverhalten der SPS bei Raumtemperatur mit Glycerin -, Natriumascorbat- und Mercaptoethanolzugabe.....	164
Tabelle 3.6-4: Aktivität der SPS bei Raumtemperatur mit NaCl haltigen Puffern bei 4-stündiger Inkubation.....	164
Tabelle 3.6-5: Stabilität der SPS bei 4° C mit Glycerinzusatz und erhöhter Proteinkonzentration durch BSA Zugabe.....	165
Tabelle 3.6-6: Stabilität der SPS in gereinigten Fraktionen. Einfluß des pH-Wertes, von Natriumascorbat- und Glycerinzugabe bei 4°C sowie wiederholtes Schockgefrieren und Lagerung bei –80° C.	166
Tabelle 3.6-7: Einfluss von Natriumascorbat, DTT, BSA und Mercaptoethanol auf die enzymatische Aktivität der SPS.	174
Tabelle 3.6-8: Molekulargewichte (M _r), dekadische Logarithmen der Molekulargewichte (log M _r) und Verteilungskoeffizient k _{av} der verwendeten Eichproteine nach Auftrennung an Sephacryl S-200 und an Superose 12 HR.	181
Tabelle 3.7-1: Anreicherungstabelle für die Reinigung der Styrylpyronsynthase an Superose 12 /HR.....	184
Tabelle 3.7-2: Anreicherungstabelle für Reinigung der Styrylpyronsynthase an Sephacryl S-200.....	186
Tabelle 3.7-3: Anreicherungstabelle für Reinigung der Styrylpyronsynthase an Hydroxylapatit (Calbiochem).....	189
Tabelle 3.7-4: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS an verschiedenen HIC Materialien.....	190
Tabelle 3.7-5: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS an Alkylsepharose.	192
Tabelle 3.7-6: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS an HIC RESOURCE Materialien.....	193
Tabelle 3.7-7: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS an Ionenaustausch-Materialien.....	194
Tabelle 3.7-8: Anreicherungstabelle für die Reinigung der SPS mit wiederholter Chromatographie an HIC RESOURCE Isopropyl	198
Tabelle 3.7-9: Anreicherungstabelle für die Reinigung der Styrylpyronsynthase-Aktivität aus <i>Equisetum arvense</i> L. Gametophyten Sterilkulturen.	200
Tabelle 3.8-1: Charakteristische Eigenschaften verschiedener Polyketidsynthasen..	36

Tabelle 7.1-1: Detektierte phenolische Komponenten in sporophytischen und gametophytischen Geweben von *Equisetum* geordnet nach der relativen Retentionszeit.

Neben- bzw. Spurenkomponenten, die sich keinem chemischen Grundkörper zuordnen ließen, wurden nicht berücksichtigt. HZS = unbekanntes Hydroxyzimtsäurederivat, EP = Equisetumpyron, MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, glc = Glucose

Peak-Nr.	Komponente	Maxima des <i>on-line</i> UV-Spektrums [nm]	absolute Retentionszeit [min] (\pm 0,9)	relative Retentionszeit [min] (\pm 0,2)
1	HZS "H1"	214; 291; 316	3,4	0,103
2	HZS "H2"	220; 248; 336	5,2	0,158
3	HZS "H3"	236; 340	5,6	0,170
4	Protoflavonoid "PF1"	228; 245; 290	5,8	0,176
5	HZS "H4"	214; 228; 288; 314	7,0	0,213
6	Unbekanntes Phenol	280	7,5	0,228
7	HZS "H5"	280; 334	8,0	0,243
8	Chlorogensäure	217; 230; 323	8,2	0,219
9	HZS "H6"	285; 313	8,7	0,264
10	MKMWS	216; 236; 327	9,9	0,301
11	"Pyron 12"	219; 252; 364	12,0	0,365
12	Unbekanntes Phenol	214; 258; 348	12,1	0,368
13	HZS "H7"	290; 320	12,7	0,386
14	Protoflavonoid "PF2"	229; 249; 296	13,6	0,413
15	Pyron "P14"	260; 370	14,0	0,426
16	HZS "H8"	247; 338	14,5	0,441
17	HZS "H9"	323	14,8	0,450
18	HZS "H10"	337	16,1	0,489
19	HZS "H11"	226; 313	16,2	0,492
20	Protoflavonoid "PF3"	226; 248; 295	16,3	0,495
21	Protoapigenin-4'-O-glc	227; 248; 296	16,6	0,505
22	Pyron "P16"	250; 263	17,0	0,517
23	HZS "H12"	215; 327	17,5	0,532
24	HZS "C2"	216; 239; 329	18,2	0,553
25	Equisetumpyron	219; 253; 372	19,5	0,593
26	Pyron "P20"	259; 385	20,3	0,617
27	HZS "H13"	284; 334	20,8	0,632
28	Protoflavonoid "PF4"	250; 292-298	21,3	0,647
29	HZS "H14"	248; 363	21,4	0,650
30	Pyron "P21"	359; 370	21,5	0,653
31	"Pyron 1"	215; 259; 358	21,7	0,660
32	Pyron "P22"	222; 256; 373	22,4	0,681
33	Protoflavonoid "PF5"	254; 297	22,7	0,690
34	HZS "H15"	226; 313	23,4	0,711
35	HZS "H16"	235; 327	24,5	0,745
36	3'-Dehydroxy-EP	215; 270; 367	25,4	0,772
37	"Pyron 3"	249; 372	26,3	0,801
38	Protogenkwanin-4'-O-glc	231; 250; 297	26,8	0,815
39	p-Methoxy-EP	220; 253; 369	28,7	0,872
40	HZS "H17"	256; 296; 335	29,0	0,881
41	"Pyron 5"	252; 369	30,0	0,912
42	HZS "H18"	272-295; 326-330	30,2	0,918
IS	Rutin (Innerer Standard)	255; 353	32,9	1,000
43	Pyron "P34"	252; 372	34,2	1,040
44	HZS "H19"	280; 330	35,8	1,088
45	HZS "H20"	275; 303; 327	35,7	1,085
46	Pyron "P37"	252; 366	37,2	1,131
47	Pyron "P38"	252; 366	37,8	1,149
48	Apigenin-4'-O-glc	266; 323-327	38,5	1,170
49	Pyron "P39"	265; 368	39,2	1,191
50	DKMWS	214; 242; 328	40,2	1,222
51	Pyron "P42"	250; 363	42,3	1,286
52	Pyron "P45"	265; 364	45,5	1,383
53	HZS "H21"	332	46,1	1,401
54	HZS "H22"	298; 316	16,2	1,404
55	Hydroxyhispidin-Dimer	255; 370	16,5	1,413
56	Pyron "P48"	260; 386	48,1	1,462
57	HZS "H23"	398; 313	51,3	1,559
58	Pyron "P52"	260; 366-370	52,3	1,590
59	HZS "H24"	265; 337	55,2	1,678
60	Pyron "P58"	260; 370	56,8	1,726

Tabelle 7.1-2: Absolute und relative Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in sporophytischen Geweben von *E. arvense* L.

BG = Botanischer Garten der Universität Würzburg, T = Topfkultur, EP = Equisetumpyron, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat, MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt, - = keine Detektion, (*) Daten wurden zur Berechnung der intrapezifischen Variation herangezogen (Vgl. Tab. 4.2.1).

Probenummer	008AB1				004AJR1				005AJK1	004AJR4		006AJG1	104AJ1		016AFR2		053AFR1	
Pflanze	<i>E. arv.</i> BG/T																	
Standort	Bochum	Bochum	Bochum	Bochum	Bochum	Japan	Japan	Japan	Japan	Japan	Aussaat	Aussaat	Finnland	Finnland	Arzneipfl.	Arzneipfl.	"Steppe"	"Steppe"
Herkunft	A 9101	A 9002a	A 8901	A 8901	A 9006	A 9006	garten	garten										
Kultur	A 9101	A 9002a	A 8901	A 8901	A 9006	A 9006												
Erntedatum	21.04.94	21.04.94	27.07.94	28.08.94	17.10.94	21.04.94	21.04.94	27.07.94	21.04.94	27.07.94	28.04.94	28.04.94	21.04.94	27.07.94	01.09.94	29.07.94		
Organ	Rhizom	Rhizom- spitzen	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	sterile grüne Tr.	Rhizom- spitzen	Rhizom	sterile grüne Tr.	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom		
Peak Komponente	Gehalte	[% TG]																
25 Equisetumpyron	0,709	2,138	0,419	0,217	0,293	0,225	0,138	0,222	-	0,482	0,252	0,075	0,298	0,236	0,373	0,304		
11 "Pyron 12"	0,011	-	0,000	0,009	0,009	0,004	0,003	0,003	-	-	0,004	0,004	0,012	0,003	-	-		
31 "Pyron 1"	0,013	0,134	0,022	0,004	0,004	0,008	0,006	-	-	-	0,007	0,009	0,007	0,010	0,011	0,010		
36 3'-Dehydro-EP	0,190	0,665	0,059	0,047	0,066	0,046	0,020	0,043	-	0,198	0,067	-	0,053	0,044	0,064	0,046		
37 "Pyron 3"	0,009	0,011	0,022	0,008	0,007	0,015	0,003	0,014	-	-	0,010	0,005	0,016	0,006	0,016	0,013		
39 p-Methoxy-EP	0,453	1,670	0,079	0,147	0,208	0,173	0,046	0,163	-	1,045	0,144	0,015	0,170	0,139	0,120	0,081		
41 "Pyron 5"	0,002	0,048	0,001	0,004	0,004	0,004	0,003	0,005	-	-	0,003	0,004	0,004	0,001	-	0,004		
weitere Pyrone	-	0,032	-	-	-	-	-	-	-	0,006	-	-	-	-	-	-		
Gesamtgehalt Pyrone	1,202	4,708	0,6	0,421	0,578	0,461	0,212	0,439	-	1,758	0,472	0,101	0,547	0,436	0,577	0,452		
2 HZS "H2"	0,011	0,011	0,034	0,009	0,013	0,010	0,007	0,001	-	0,027	0,010	0,017	0,005	0,012	0,022	0,014		
3 HZS "H3"	0,025	0,010	0,012	0,011	0,005	0,010	0,007	0,010	-	0,004	0,010	0,022	0,010	0,009	0,006	0,006		
9 HZS "H6"	0,004	-	0,008	-	-	0,009	0,001	0,001	-	-	0,005	-	-	-	-	0,003		
10 MKMWS	0,023	0,085	0,013	0,011	0,011	0,022	0,005	0,009	0,016	0,320	0,015	0,023	0,015	0,01	0,016	0,008		
16 HZS "H8"	0,021	0,010	0,013	0,015	0,014	-	0,012	0,023	0,046	0,013	0,014	-	0,020	0,012	0,013	0,011		
23 HZS "H12"	0,003	0,010	-	-	-	0,004	-	-	0,071	0,021	-	0,064	-	-	-	-		
24 HZS "C2"	0,004	0,032	0,003	0,004	0,004	-	0,006	-	0,05	0,088	0,003	0,005	0,005	0,001	0,006	0,002		
35 HZS "H16"	0,001	-	0,005	-	0,001	0,004	0,001	0,003	0,026	0,018	0,002	0,035	0,002	0,002	-	0,002		
50 DKMWS	0,049	0,411	0,045	0,007	0,009	0,004	0,001	0,004	0,168	0,363	0,020	0,637	0,006	0,006	0,057	0,027		
weitere HZS	-	0,010	-	-	-	-	-	-	-	0,016	-	-	-	-	-	-		
Gesamtgehalt HZS	0,138	0,564	0,131	0,053	0,054	0,056	0,038	0,062	0,415	1,052	0,081	0,802	0,070	0,051	0,117	0,093		
Gesamtgehalt Phenole	1,340	5,272	0,731	0,474	0,632	0,517	0,025	0,501	0,415	2,810	0,553	0,903	0,617	0,487	0,694	0,545		
Quotienten	relative Gehalte [%]																	
EP/Ges. Pyrone	59	45	70	52	51	49	65	51	-	27	53	74	54	54	65	67		
Pyrone/Ges. Phenole	90	89	82	89	91	89	85	88	-	6	85	11	89	90	83	83		
HZS/Ges. Phenole	10	11	18	11	9	11	15	12	100	37	15	89	11	10	17	17		

Tabelle 7.1-3: Absolute und relative Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in sporophytischen Geweben verschiedener Arten von *Equisetum*.

BG = Botanischer Garten der Universität Würzburg, T = Topfkultur, EP = Equisetumpyron, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat, MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt, - = keine Detektion, + = Detektion aber [%TG] < 0,001.

Probennummer	025FGR	027FGL	SYL--1				002LSI1		012LFR1		042TLX3		043TLY3	044TLZ3	045TLK3	040TLR3
Pflanze	<i>E. fluv.</i>	<i>E. fluv.</i>	<i>E. prat.</i>	<i>E. prat.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. pal.</i>	<i>E. telm.</i>								
Standort	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T
Herkunft	Skye	Skye			Rhön	Rhön	Sinntal	Sinntal	Sinntal	Finnland		Lorch	Lorch	Lorch	Lorch	Lorch
Kultur	F 9103	F 9103	PR 8901	PR 8901	S 8901	S 8901										T 9406
Erntedatum	20.04.94	20.04.94	14.08.94	21.04.94	21.04.94	14.08.94	28.04.94	28.04.94	28.04.94	21.04.94	07.06.94	07.06.94	07.06.94	07.06.94	07.06.94	21.06.94
Organ	Rhizom	Rhizom-	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom-	Adventiv-	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Bereich I		Bereich II	Rhizom
Peak Komponente	Gehalte		[% TG]													
25 Equisetumpyron	0,190	0,538	0,005	0,011	0,004	0,004	0,237	0,333	0,419	0,053	0,048	0,242	0,076	0,010	0,006	0,033
11 "Pyron 12"	0,035	0,048	-	0,003	-	-	0,007	0,022	0,025	0,001	0,002	-	-	-	-	-
31 "Pyron 1"	-	-	-	-	-	-	-	-	0,011	0,004	-	0,006	0,005	-	-	-
36 3'-Dehydro-EP	0,010	0,050	-	0,002	-	-	0,017	0,005	-	0,004	-	0,026	0,012	-	-	-
37 "Pyron 3"	0,017	0,023	-	-	-	-	0,003	0,010	0,009	0,009	-	-	-	-	-	-
39 p-Methoxy-EP	0,005	0,011	-	0,005	-	-	0,011	0,009	+	+	0,004	-	-	-	-	-
41 "Pyron 5"	0,013	-	-	0,003	0,004	0,008	0,006	0,008	+	0,004	-	0,011	0,009	0,009	0,003	0,014
weitere Pyrone	-	-	-	-	-	-	0,131	0,205	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamtgehalt Pyrone	0,280	0,657	0,005	0,019	0,008	0,012	0,393	0,576	0,464	0,069	0,052	0,278	0,095	0,017	0,008	0,044
1 HZS "H1"	-	-	0,025	0,410	0,079	0,070	-	-	-	-	-	0,372	0,159	0,070	0,006	0,261
2 HZS "H2"	0,007	0,011	-	-	-	-	0,013	0,010	0,023	+	0,006	-	-	-	-	-
3 HZS "H3"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 HZS "H4"	-	-	-	-	0,014	0,012	-	-	-	-	-	0,012	0,002	-	0,004	0,003
7 HZS "H5"	-	-	-	-	-	-	-	0,012	-	-	0,003	-	-	-	-	-
8 Chlorogensäure	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 HZS "H6"	-	-	-	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 MKMWS	-	-	-	-	-	-	0,004	0,012	-	-	0,002	+	-	-	-	-
18 HZS "H10"	-	-	-	-	+	-	0,003	0,002	0,005	-	-	-	-	-	-	-
24 HZS "C2"	0,007	0,011	0,173	0,074	0,161	0,079	0,057	0,143	0,018	0,045	0,033	0,089	0,018	0,012	0,028	0,21
34 HZS "H15"	-	-	0,065	0,074	0,001	-	-	-	0,001	+	0,007	+	+	+	+	+
35 HZS "H16"	-	-	0,048	0,038	0,014	-	+	0,020	0,006	0,007	0,006	0,001	-	-	+	0,009
50 DKMWS	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamtgehalt HZS	0,017	0,060	0,321	0,609	0,278	0,176	0,087	0,222	0,061	0,065	0,061	0,494	0,192	0,087	0,040	0,494
Gesamtgehalt Phenole	0,297	0,717	0,326	0,628	0,286	0,188	0,48	0,798	0,525	0,134	0,113	0,772	0,287	0,104	0,048	0,538
Quotienten	relative Gehalte [%]															
EP/Ges. Pyrone	68	82	100	58	50	33	60	58	90	77	92	87	80	59	75	75
Pyrone/Ges. Phenole	94	92	2	3	3	6	82	72	88	51	46	36	33	16	17	8
HZS/Ges. Phenole	6	8	98	97	97	94	18	28	12	49	54	64	67	84	83	92

Fortsetzung Tabelle 7.1-3: Absolute und relative Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in sporophytischen Geweben verschiedener Arten von *Equisetum*.

BG = Botanischer Garten der Universität Würzburg, T = Topfkultur, EP = Equisetumpyron, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat, MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt, - = keine Detektion, + = Detektion aber [%TG] < 0,001.

Probenummer	29QGR1	48RBR1	049RBI1	01RSR1	032IBR1	034XBR1	46DSR1	61HGR1	07GGR1	64MGR1	60VGR1	62SGR1
Pflanze	<i>E. f.-q.</i>	<i>E. roth.</i>	<i>E. roth.</i>	<i>E. roth.</i>	<i>E. lit.</i>	<i>E. lit.</i>	<i>E. dycei</i>	<i>E. hye.</i>	<i>E. gig.</i>	<i>E. ram.</i>	<i>E. var.</i>	<i>E. scirp.</i>
Standort	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	BG/T	Tropeng.	BG/T	BG/T	BG/T
Herkunft	Skye	Schottl.	Schottl.	Skye	Bochum	Bochum	Skye	Bot Gart.	Bot Gart.	Bot Gart.	"17004"	"1224C"
Kultur	FQ 9101	R 9101	R 9101	R 9001	L 9001	"L2"	D 9101	-	-	-	-	-
Erntedatum	27.04.94	07.06.94	07.06.94	27.04.94	28.04.94	28.04.94	07.06.94	12.08.94	12.08.94	12.08.09	12.08.94	12.08.94
Organ	Rhizom	Rhizom	Rhizomspitzen	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom	Rhizom
Peak Komponente	Gehalte [% TG]											
25 Equisetumpyron	0,333	0,579	1,946	0,515	0,514	0,364	0,938	0,569	0,412	0,12	0,268	0,265
11 "Pyron 12"	0,002	0,026	0,049	0,167	0,047	0,031	0,096	0,248	0,027	-	0,071	0,374
31 "Pyron 1"	0,009	-	0,006	-	-	-	-	0,055	0,009	0,005	0,016	0,027
36 3'-Dehydro-EP	0,005	0,115	0,585	0,062	0,031	0,03	0,047	0,035	0,051	0,008	0,006	0,047
37 "Pyron 3"	0,005	0,011	0,017	0,011	0,024	0,019	0,021	0,007	0,009	0,007	0,006	0,022
39 p-Methoxy-EP	-	0,125	0,594	0,129	0,053	0,062	0,082	0,339	0,14	0,603	0,51	0,087
41 "Pyron 5"	0,006	0,009	0,012	0,008	0,004	0,004	0,007	0,011	0,017	0,012	0,019	0,019
43 Pyron "P34"	-	-	-	-	-	-	-	0,001	-	-	-	0,001
49 Pyron "P37"	-	-	-	-	-	-	-	0,007	-	0,005	0,008	0,002
51 Pyron "P42"	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-	0,15	0,024
Gesamtgehalt Pyrone	0,349	0,854	3,172	0,88	0,662	0,487	1,192	1,268	0,659	0,746	0,894	0,842
1 HZS "H1"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 HZS "H2"	0,005	-	-	0,018	-	-	-	0,027	0,043	0,001	0,01	0,022
3 HZS "H3"	0,008	0,001	0,032	0,024	0,025	0,023	0,045	-	-	-	-	-
7 HZS "H5"	0,005	-	0,032	-	0,006	0,01	-	-	-	-	-	-
10 MKMWS	+	0,008	0,163	0,025	0,011	0,021	0,011	-	0,06	0,001	-	-
17 HZS "H9"	-	-	-	-	-	-	-	0,009	0,014	0,001	-	-
18 HZS "H10"	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
19 HZS "H11"	-	-	-	-	-	-	-	-	0,041	-	-	-
24 HZS "C2"	0,009	0,005	0,043	0,084	0,004	0,006	-	-	0,087	0,009	0,006	-
27 HZS "H13"	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001	-	-	-
34 HZS "H15"	-	-	-	-	-	-	-	-	0,015	0,001	-	-
35 HZS "H16"	0,002	+	+	0,004	0,003	-	0,005	0,01	0,058	0,017	0,008	0,001
50 DKMWS	-	0,019	0,323	0,017	0,01	0,002	0,013	-	-	-	-	-
Gesamtgehalt HZS	0,038	0,04	0,725	0,143	0,063	0,064	0,084	0,048	0,412	0,05	0,026	0,024
Gesamtgehalt Phenole	0,387	0,894	3,897	1,023	0,725	0,551	1,276	1,316	1,071	0,796	0,92	0,866
Quotienten	relative Gehalte [%]											
EP/Ges. Pyrone	95	68	61	59	78	75	79	45	63	16	30	91
Pyrone/Ges. Phenole	90	96	81	86	91	88	93	96	62	94	97	97
HZS/Ges. Phenole	10	4	19	14	9	12	7	4	38	6	3	3

Tabelle 7.1-4: Absolute und relative Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in einzelnen Internodien von Sprossabschnitten aus dem Übergangsbereich von Rhizom zu "photosynthetisch aktivem Spross" von *E. arvense* L.

R = Rhizom, G = Grüner Spross, EP = Equisetumpyron, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat, MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt, Flav. = Flavonoide, Phe. = Phenole. - = keine Detektion.

Internodium/Gewebe	R	1	2	3	4	5	6	G
Peak Komponente	Gehalte [% TG]							
25 Equisetumpyron	0,804	0,670	0,181	0,086	0,017	0,010	0,009	-
11 "Pyron 12"	0,003	0,002	-	-	-	-	-	-
31 "Pyron 1"	0,017	0,021	0,010	0,003	-	-	-	-
36 3'-Dehydro-EP	0,322	0,060	0,003	0,002	+	-	-	-
37 "Pyron 3"	0,017	0,020	-	-	-	-	-	-
39 p-Methoxy-EP	0,385	0,167	0,017	0,003	-	-	-	-
41 "Pyron 5"	0,013	0,028	0,009	0,030	+	+	-	-
Gesamtgehalt Pyrone	1,552	0,952	0,214	0,100	0,017	0,010	0,009	-
2 HZS "H2"	0,088	0,155	0,145	0,143	0,119	0,135	0,145	0,036
10 MKMWS	0,067	0,033	0,060	0,072	0,118	0,146	0,145	0,028
16 HZS "H8"	0,015	0,024	-	-	-	-	-	-
23 HZS "H12"	-	-	-	0,015	0,015	0,013	0,020	0,004
24 HZS "C2"	0,004	0,007	0,020	0,050	0,095	0,122	0,109	0,030
34 HZS "H15"	-	-	-	0,006	0,007	0,010	0,020	0,009
50 DKMWS	0,177	0,054	0,020	0,050	0,095	0,122	0,109	0,044
Gesamtgehalt HZS	0,375	0,335	0,475	0,506	0,720	0,891	0,776	0,170
Gesamtgehalt Flav.	-	-	-	0,050	0,111	0,084	0,094	0,227
Gesamtgehalt Phenole	1,927	1,287	0,689	0,656	0,848	0,985	0,879	0,397
Quotienten	relative Gehalte [%]							
DKMWS/Ges.HZS	47	16	43	46	50	47	41	25
Ges. Pyrone/Ges. Phe.	81	74	31	15	2	1	1	-
Ges. HZS/Ges. Phe.	19	26	69	77	84	90	88	43
Ges. Flav./Ges. Phe.	-	-	-	-	13	9	11	57

Tabelle 7.1-5: Absolute und relative Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in gametophytischen Geweben von *E. arvense* L.

EP = Equisetumprylon, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat, ,MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt, - = keine Detektion, + = Detektion aber [%TG] < 0,001, Proth = Prothallium, Phe. = Phenole,

Probennummer	322A3P3	316A1P1	316A1A1	321A2P2	320A1P1	314J3P1	323J5P1	323J5P1	325J7P1
Art	<i>E. arv.</i>	<i>E. arv.</i>		<i>E. arv.</i>					
Stamm	304/261	304/261		304/261	304/261	"Japan"	"Japan"	"Japan"	"Japan"
Medium	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+
Subkulturdauer [d]	57	91	91	116	197	21	26	25	48
Subkulturen seit Aussat	4	4		3	2	4	4	5	2
Gesamtkulturdauer [d]	442	363		442	442	368	368	393	393
Gewebebereich	gesamt Proth.	gesamt Proth.	Agar von 316A1P1	gesamt Proth.					
Peak Komponente	Gehalte [% TG]								
25 Equisetumprylon	0,119	0,604	0,004	0,273	0,535	0,375	0,509	0,438	0,240
31 "Pyron 1"	0,005	0,218	0,007	0,011	0,118	0,018	0,028	0,049	0,020
36 3'-Dehydro-EP	0,008	0,044	0,001	0,024	0,028	0,024	0,028	0,027	0,013
37 "Pyron 3"	-	0,017	0,001	-	0,008	0,068	-	0,004	0,004
39 p-Methoxy-EP	0,105	0,036	-	0,011	0,014	0,002	0,099	0,049	0,015
41 "Pyron 5"	-	0,113	0,002	-	0,104	0,005	0,005	0,006	0,004
weitere Pyrone	0,003	0,407	0,003	0,004	0,278	-	-	0,006	0,008
Gesamtgehalt Pyrone	0,135	1,432	0,016	0,311	1,070	0,481	0,662	0,565	0,290
2 HZS "H2"	0,001	0,014	0,002	0,004	0,011	0,003	0,002	0,003	+
7 HZS "H5"	-	-	-	-	-	0,001	-	0,001	-
10 MKMWS	0,012	0,015	0,002	0,040	0,018	0,008	0,011	0,019	0,010
18 HZS "H10"	-	-	-	-	-	0,009	0,008	0,010	0,004
19 HZS "H11"	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 HZS "H12"	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 HZS "C2"	0,008	0,014	0,002	0,086	0,016	-	0,012	0,012	0,009
34 HZS "H15"	-	-	-	0,002	-	-	-	-	-
35 HZS "H16"	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40 HZS "H17"	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 HZS "H18"	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50 DKMWS	0,124	0,063	0,002	0,182	0,091	0,143	0,230	0,243	0,211
Gesamtgehalt HZS	0,162	0,113	0,009	0,335	0,147	0,194	0,286	0,319	0,254
Gesamtgehalt Phenole	0,297	1,545	0,025	0,646	1,217	0,675	0,948	0,884	0,544
Quotienten	relative Gehalte [%]								
HZS "C2"/Ges. HZS	5	13	22	26	11	5	4	4	7
DKMWS/Ges. HZS	77	56	22	54	62	74	80	76	83
EP/Ges. Pyrone	88	42	25	88	50	78	77	78	83
Pyrone/Ges. Phenole	45	93	64	48	88	71	70	64	53
HZS/Ges. Phenole	55	7	36	52	12	29	30	36	47
Pyron Spurenkomponenten									
22 Pyron "P16"	+	-	-	+	+	-	-	-	+
30 Pyron "P21"	+	+	-	+	+	+	-	-	-
47 Pyron "P38"	-	++	-	+	++	-	-	-	-
49 Pyron "P39"	+	+	-	-	+	-	-	-	-
52 Pyron "P45"	-	+	-	-	+	-	-	-	-
56 Pyron "P48"	-	+	-	-	+	-	-	-	-
58 Pyron "P52"	-	+	-	-	+	-	-	-	+
60 Pyron "P58"	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Tabelle 7.1-6: Absolute und relative Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in gametophytischen Geweben von *E. fluviatile*.

EP = Equisetumprylon, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat, ,MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt, - = keine Detektion, + = Detektion aber [%TG] < 0,001, Proth = Prothallium, Phe. = Phenole,

Probennummer	303F3P2	304F2P1	327F5P1	328FAP1	328FBP1	328FCP1	326F4P1	326F4B1	305F2P1
Art	<i>E. fluvi.</i>	<i>E. fluvi.</i>	<i>E. fluvi.</i>	<i>E. fluvi.</i>	<i>E. fluvi.</i>	<i>E. fluvi.</i>	<i>E. fluvi.</i>	<i>E. fluvi.</i>	<i>E. fluvi.</i>
Medium	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+
Subkulturdauer [d]	22	40	51	52	52	52	114	114	124
Subkulturen seit Aussat	3	3	4	3	3	3	2	2	1
Gesamtkulturdauer [d]	395	395	395	395	395	395	395	395	370
Gewebebereich	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.	innere Bereiche	grüne Bereiche	gesamt Proth.	innere Bereiche	gesamt Proth.
Peak Komponente	Gehalte [% TG]								
25 Equisetumprylon	0,012	0,275	0,104	0,159	0,273	0,064	0,105	0,218	0,323
31 "Pyron 1"	-	-	-	0,009	0,012	0,007	-	-	-
36 3'-Dehydro-EP	+	0,090	-	-	0,006	-	-	0,005	0,010
37 "Pyron 3"	-	0,006	-	-	-	-	-	-	-
39 p-Methoxy-EP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41 "Pyron 5"	-	-	-	-	0,008	-	-	-	-
weitere Pyrone	-	0,011	0,012	0,017	0,054	0,008	0,008	-	0,015
Gesamtgehalt Pyrone	0,012	0,298	0,115	0,183	0,342	0,074	0,113	0,221	0,344
2 HZS "H2"	-	0,004	+	+	+	0,005	0,005	0,005	0,016
10 MKMWS	-	0,012	0,008	0,007	+	0,007	0,031	0,004	0,018
17 HZS "H9"	+	0,002	+	+	+	+	0,003	0,004	-
24 HZS "C2"	0,003	0,005	+	0,008	0,008	0,006	0,026	0,004	0,021
34 HZS "H15"	+	+	0,001	0,002	-	+	0,003	0,010	-
40 HZS "H17"	+	0,001	-	-	-	-	0,004	0,002	0,002
42 HZS "H18"	-	-	-	-	-	+	0,003	0,004	0,004
45 HZS "H20"	0,005	0,043	0,007	0,007	0,010	0,004	0,057	0,003	0,078
50 DKMWS	0,004	0,025	0,011	0,02	0,010	0,021	0,026	0,049	0,034
53 HZS "H21"	0,004	0,008	-	0,002	-	0,001	0,005	0,027	0,017
57 HZS "H23"	-	0,007	0,005	+	-	0,004	+	0,001	0,001
59 HZS "H59"	0,006	0,013	-	-	0,004	-	-	-	0,090
Gesamtgehalt HZS	0,024	0,120	0,032	0,046	0,032	0,043	0,165	0,116	0,200
Gesamtgehalt Phenole	0,036	0,418	0,147	0,229	0,374	0,117	0,278	0,337	0,544
Quotienten	relative Gehalte [%]								
HZS "C2"/Ges. HZS	13	4	-	17	25	14	16	3	11
DKMWS/Ges. HZS	17	21	34	43	31	49	16	42	17
EP/Ges. Pyrone	100	92	90	87	80	86	93	99	94
Pyrone/Ges. Phenole	33	71	78	80	91	63	41	66	63
HZS/Ges. Phenole	67	29	22	20	9	37	59	34	37
weitere Spurenkomponenten									
4 "PF1"	-	-	-	-	-	+	+	+	+
14 "PF2"	-	+	+	-	-	-	+	+	+
20 "PF3"	-	+	-	+	+	+	+	+	+
21 Protoapig.4'-O-glc	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28 "PF4"	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49 Pyron "P39"	-	+	-	+	+	+	+	-	-
52 Pyron "P45"	-	+	-	-	+	+	-	-	-
56 Pyron "P48"	-	-	-	+	+	-	-	-	-
58 Pyron "P52"	-	-	+	+	+	-	-	-	-
60 Pyron "P58"	-	-	+	+	+	-	-	-	-

Tabelle 7.1-7: Absolute und relative Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in gametophytischen Geweben von *E. sylvaticum*.

EP = Equisetumpyron, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat, MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt, - = keine Detektion, + = Detektion aber [%TG] < 0,001, Proth = Prothallium, Phe. = Phenole,

Probenummer	306S4P1	307S3P1	311S4P1	310S3P1	332S6P1	333S7B1	309S2P3	352S-P1	352S-P1	341SP-1
Art	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>	<i>E. syl.</i>
Stamm	S 8901	S 8901	S 8902	S 8903	S 8904	S 8905	S 8906	S 8907	S 8908	S 8909
Medium	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0-	MS0-
Subkulturdauer [d]	23	23	27	40	61	48	48	92	120	63
Subkulturen seit Aussat	4	4	4	3	3	4	4	4	2	1
Gesamtkulturdauer [d]	416	416	416	416	418	418	418	418	418	418
Gewebebereich	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.	grüne Bereiche	innere Bereiche	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.
Peak Komponente	Gehalte [% TG]									
25 Equisetumpyron	0,009	0,014	0,013	0,044	0,048	0,006	0,021	0,023	0,003	0,004
31 "Pyron 1"	-	0,003	-	0,013	0,017	0,004	0,013	0,009	-	-
36 3'-Dehydro-EP	0,004	0,007	0,006	0,010	0,016	0,004	0,096	0,009	-	-
37 "Pyron 3"	-	-	-	0,003	0,005	+	0,004	0,005	-	-
39 p-Methoxy-EP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41 "Pyron 5"	-	-	-	-	-	0,003	0,004	+	-	-
weitere Pyrone	-	-	-	0,010	0,001	-	0,018	0,045	0,003	0,006
Gesamtgehalt Pyrone	0,011	0,020	0,018	0,080	0,128	0,011	0,063	0,084	0,006	0,010
1 HZS "H1"	0,156	0,058	0,146	0,074	0,118	0,036	0,055	0,028	0,001	+
4 HZS "H4"	0,043	0,014	0,055	0,03	0,039	0,009	0,015	0,007	0,001	+
10 MKMWS	0,023	0,020	0,028	0,040	0,056	0,017	0,018	0,023	0,020	0,035
19 HZS "H11"	0,019	0,016	0,017	0,015	0,013	0,005	0,011	0,004	0,003	0,004
24 HZS "C2"	0,048	0,031	0,079	0,099	0,055	0,028	0,041	0,055	0,060	0,023
34 HZS "H15"	0,025	0,028	0,045	0,061	0,018	0,016	0,052	0,016	0,016	0,007
40 HZS "H17"	-	-	+	0,004	0,190	-	-	+	-	0,007
44 HZS "H19"	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
50 DKMWS	0,090	0,046	0,087	0,067	0,056	0,034	0,040	0,020	0,013	0,034
54 HZS "H22"	0,041	0,025	0,037	0,020	0,012	0,010	0,016	+	0,001	0,003
57 HZS "H23"	0,041	0,035	0,032	0,012	0,005	0,010	0,014	-	0,001	-
Gesamtgehalt HZS	0,476	0,261	0,52	0,436	0,407	0,181	0,270	0,178	0,126	0,123
Gesamtgehalt Phenole	0,487	0,281	0,538	0,516	0,535	0,192	0,333	0,262	0,132	0,133
Quotienten	relative Gehalte [%]									
HZS "C2"/Ges. HZS	10	12	15	23	14	15	15	31	48	19
DKMWS/Ges. HZS	19	18	17	15	14	19	15	11	10	28
EP/Ges. Pyrone	82	70	72	55	38	55	33	27	50	40
Pyrone/Ges. Phenole	2	7	3	16	24	6	19	32	5	8
HZS/Ges. Phenole	98	93	97	84	76	94	81	68	95	92
Pyron Spurenkomponenten										
30 Pyron "P21"	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
47 Pyron "P38"	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
56 Pyron "P48"	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
58 Pyron "P52"	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
60 Pyron "P58"	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-

Tabelle 7.1-8: Absolute und relative Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in gametophytischen Geweben von *E. telmateia* und *E. palustre*.

EP = Equisetumpyron, HZS = Hydroxyzimtsäurederivat, MKWS = Monokaffeoyl-meso-weinsäure, DKMWS = Dikaffeoyl-meso-weinsäure, Ges. = Gesamtgehalt, - = keine Detektion, + = Detektion aber [%TG] < 0,001, Proth = Prothallium, Phe. = Phenole,

Probenummer	351T1P1	347L0P1	346L8P1	319L3P1	301L1P1	389L9P1
Art	<i>E. telm.</i>	<i>E. pal.</i>				
Medium	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0+	MS0-
Subkulturdauer [d]	50	83	104	64	89	75
Subkulturen seit Aussat	2	3	3	3	3	4
Gesamtkulturdauer [d]	100	486	486	486	486	486
Gewebebereich	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.	gesamt Proth.
Peak Komponente	Gehalte [% TG]					
25 Equisetumpyron	0,048	0,003	0,003	0,027	0,023	+
31 "Pyron 1"	0,005	0,003	0,002	0,023	0,031	-
36 3'-Dehydro-EP	0,003	0,001	0,001	0,010	0,008	-
37 "Pyron 3"	-	-	-	-	-	-
39 p-Methoxy-EP	-	-	-	-	-	-
41 "Pyron 5"	-	0,001	-	0,008	+	-
weitere Pyrone	0,029	0,005	0,013	0,057	0,182	-
Gesamtgehalt Pyrone	0,065	0,010	0,017	0,115	0,238	-
2 HZS "H4"	-	-	-	+	-	-
10 MKMWS	0,042	0,006	0,007	0,007	0,018	0,004
19 HZS "H11"	0,004	-	-	-	-	-
23 HZS "H12"	+	-	-	-	-	-
24 HZS "C2"	0,093	0,050	0,04	0,060	0,092	0,011
34 HZS "H15"	0,017	0,006	0,01	0,004	0,017	-
35 HZS "H16"	0,007	0,002	0,001	0,005	-	+
40 HZS "H17"	0,005	0,001	-	-	+	-
50 DKMWS	0,021	0,007	0,005	0,005	0,018	+
54 HZS "H22"	0,005	-	-	-	-	-
57 HZS "H23"	0,008	-	-	-	-	-
Gesamtgehalt HZS	0,194	0,068	0,065	0,085	0,150	0,015
Gesamtgehalt Phenole	0,259	0,078	0,082	0,200	0,332	0,015
Quotienten	relative Gehalte [%]					
HZS "C2"/Ges. HZS	48	74	62	71	61	73
DKMWS/Ges. HZS	11	10	8	6	12	-
EP/Ges. Pyrone	74	30	18	23	10	-
Pyrone/Ges. Phenole	25	13	21	58	72	-
HZS/Ges. Phenole	75	87	79	43	45	100
Pyron Spurenkomponenten						
15 Pyron "P14"	+	-	-	-	-	+
22 Pyron "P16"	-	-	-	-	-	-
56 Pyron "P48"	+	+	+	+	+	-
58 Pyron "P52"	+	+	+	+	+	-
60 Pyron "P58"	+	+	+	+	+	-

Publikationen

BECKERT, C., HORN, C., SCHNITZLER, J.-P., LEHNING, A., HELLER, W., VEIT, M. (1997) Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense* L.. Phytochemistry 44, 275 - 283.

HERDERICH, M., BECKERT, C., VEIT, M. (1997) Establishing styrylpyrone synthase activity in cell free extracts obtained from gametophytes of *Equisetum arvense* L. by HPLC-MS/MS analysis. Phytochem. Analysis 8, 194 - 197.

VEIT, M., GEIGER, H., KAST, B., BECKERT, C., HORN, C., MARKHAM, K., M., WONG, H., CZYGAN, F. - C. (1995) Styrylpyrone glycosides from *Equisetum*. Phytochemistry 39, 915 - 917.

VEIT, M., BECKERT, C., HÖHNE, C., BAUER, K., GEIGER, H. (1995) Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. Phytochemistry 38, 881 - 891.

VEIT, M., BAUER, K., BECKERT, C., KAST, B., GEIGER, H., CZYGAN, F. - C. (1995) Phenolic characters of british hybrid taxa in *Equisetum* subgenus *Equisetum*. Biochemical Systematics and Ecology 23, 79 - 87.

Vortrags- und Posterabstracts

BECKERT, C., VEIT, M., GEIGER, H., CZYGAN, F. - C. (1993) Flavonoids of *Equisetum sylvaticum*, *Equisetum pratense* and *Equisetum x bowmani*. Posterabstract, Society for Medical Plant Research. 41st Annual Congress, Düsseldorf 1993.

VEIT, M., BAUER, K., BECKERT, C., KAST, B., GEIGER, H., CZYGAN, F. C. (1994) Flavonoid characters of British hybrid taxa in *Equisetum* subgenus *Equisetum*. Posterabstract, XVIIIth International Conference on Polyphenols Palma de Mallorca 1994.

BECKERT, C., VEIT, M., CZYGAN, F. - C. (1994) Styrylpyrone Biosynthesis in *Equisetum*. Posterabstract, Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bayreuth 1994.

VEIT, M., BECKERT, C., CZYGAN, F. - C. (1995) Styrylpyrone glycosides from *Equisetum*. Posterabstract, 43rd. Annual Congress on medical plant research. Halle 1995.

BECKERT, C., VEIT, M. (1996) Polyketide synthase from *Equisetum arvense* L. Posterabstract, Meeting: Principles Regulation Biosynthesis and Storage of Secondary Products, the Phytochemical Society of Europe. Halle 1996.

BECKERT, C., HORN, C., VEIT, M. (1996) Styrylpyrone as stress metabolites in sporophytes of *Equisetum arvense* L.. Vortrag .1. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop Sekundärstoffwechsel. Halle 1996.

VEIT, M., HORN, C., BECKERT, C. (1996) Styrylpyrones as stress metabolites in *Equisetum arvense* L. sporophytes, Posterabstract Polyphenols 96 XVIII th International Conference on Polyphenols Bordeaux 1996.

VEIT, M., BECKERT, C. (1996) Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense* L. Vortrag. Meeting: Future trends in Phytochemistry, The Phytochemical society of Europe, Rolduc 1996.

BECKERT, C.;HORN, C., VEIT, M. (1997) Styrylpyrone als Stressmetaboliten in Gametophyten von *Equisetum arvense* L.. Vortrag, Rhein-Main-Botaniker Kolloquium 1997 in Karlsruhe.

BECKERT, C., VEIT, M (1997) Styrylpyronbiosynthese in Gametophyten von *Equisetum arvense* L.. Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 1997 in Würzburg.

BECKERT, C., LASKOWSKI, A., VEIT, M. (1998) Purification and characterisation of styrylpyrone synthase from gametophytes of *Equisetum arvense* L. Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 1998 in Freiburg

LEBENS LAUF

Cornelia Beckert, Loreleiring 10, 65197 Wiesbaden

PERSÖNLICHE DATEN: geb. am 06.08.1965 in Welzheim,
Kreis Waiblingen / Baden-Württemberg
verheiratet seit 1.9.2000
ein Sohn, geboren am 30.7 1997

SCHULAUSSBILDUNG: 08/1971 - 06/1975
J. G. Fischer - Grundschule in Süßen / Baden-
Württemberg
08/1975 - 06/1984
Rechberg-Gymnasium Donzdorf / Baden-Württemberg,
Abschluß: Hochschulreife

AUSBILDUNG: 02/1984 - 09/1984 und 02/1985 - 02/1986
zweisemestriges Chorleiterseminar des
Schwäbischen Sängerbundes

HOCHSCHULBILDUNG: 10/1986 - 04/1993
Biologiestudium an der Julius-Maximilians
Universität Würzburg
Studienschwerpunkte: Pharmazeutische Biologie,
Biochemie, Pflanzenökologie und Geologie
Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur
Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe in *Equisetum*
sylvaticum L. und *Equisetum pratense* Ehrh.
Thema der Promotion: Strukturen und Biosynthese von
Styrylpyronen in Gametophyten und Sporophyten in der
Gattung *Equisetum*, Subgenus *Equisetum*

PRAKTIKA: 01/09/1991 - 31/10/1991
Praktikum in der Abteilung Agrarforschung und
Entwicklung der BASF Aktiengesellschaft Ludwigshafen

BERUFSTÄTIGKEIT 07/1993 - 07/1996
Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für
Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg
08/1996 - 08/2000
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für
Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg
unterbrochen durch Mutterschutz und Erziehungsurlaub
(06/1997-03/1998)

Wiesbaden den 12.1. 2002

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe noch keinen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Wiesbaden, 12.1. 2001 Cornelia Beckert