

Struktur und Biosynthese von Streßligninen

Pilzlicher Elicitor und 3,4-Dichloranilin als Stressoren

Dissertationsschrift

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt

von

Bernd Markus Lange

aus

Arnsberg/Westfalen

Februar 1995

1. Berichtersteller: Prof. Dr. H. Sandermann

2. Berichtersteller: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.1995

Die Dissertation ist in der Schriftenreihe „Edition Wissenschaft“ des Tectum Verlags in Mikroficheform erschienen.

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Lange, Bernd Markus

Struktur und Biosynthese von Streßligninen. Pilzlicher Elicitor
und 3,4-Dichloranilin als Stressoren / von Bernd Markus Lange
[Mikrofiche-Ausg.]

Marburg: Tectum Verl., 1995

(Edition Wissenschaft; Reihe Biologie, Bd. 22)

3 Mikrofiches. - Mikroreprod. eines Ms. 214 S.

Zugl.: München, Univ., Diss., 1995

ISBN 3-89608-322-8

NE: Edition Wissenschaft / Reihe Biologie

Edition Wissenschaft
Reihe Biologie

Band 22

Struktur und Biosynthese von Streßligninen
Pilzlicher Elicitor und 3,4-Dichloranilin als Stressoren

Dissertationsschrift
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt
von
Bernd Markus Lange

Tectum Verlag
Marburg 1995

I. EINLEITUNG

1.	Aufbau pflanzlicher Zellwände und Bedeutung der Lignine	1
1.1	Chemische Zusammensetzung der Zellwände	1
1.2	Architektur der Zellwände	3
2.	Biosynthese der Lignine	7
3.	Strukturelle Variabilität der Lignine	10
4.	Lignifizierung als Abwehrreaktion höherer Pflanzen	11
4.1	Die Pflanze-Pathogen-Interaktion	11
4.2	Elicitoren als Auslöser der induzierten Lignifizierung	12
5.	Lignine als Senke für xenobiotische Chemikalien	13
5.1	3,4-Dichloranilin als Umweltchemikalie	13
5.2	Pflanzliche Entgiftung von Pestiziden	15
5.3	Bedeutung der Lignine für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände	16
5.4	Bioverfügbarkeit nicht-extrahierbarer Rückstände von 3,4-Dichloranilin	18
6.	Themenstellung	19

II. MATERIAL UND METHODEN

1.	Geräte	22
2.	Chemikalien und Enzyme	23
2.1	Lösungsmittel	23
2.2	Referenzsubstanzen	23
2.3	Sonstige Chemikalien und Materialien	24
2.4	Enzyme	26
3.	Nährmedien	27
3.1	Kulturmedium für Fichten-Suspensionskulturen	27
3.2	Nährmedium zur Anzucht von Fichten-Keimlingen	27
3.3	Kulturmedium für <i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	28
4.	Pflanzenmaterial	28
4.1	Zellkulturen	28
4.1.1	Anlage von Fichten-Suspensionskulturen	28
4.1.2	Charakterisierung der Fichten-Suspensionskulturen	29
4.2	Fichten-Keimlinge	30
4.2.1	Aseptische Anzucht der Keimlinge in Hydrokultur	30
4.2.2	Charakterisierung des Wachstumsverlaufs der Fichten-Keimlinge	31
5.	Präparation eines <i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> -Elicitors	32
6.	Elicitor-Behandlung der Fichten-Suspensionskulturen	33
7.	Ozonbehandlung von Fichten-Keimlingen	33

8.	Analyse von phenolischen Inhaltsstoffen aus Fichten-Suspensionskulturen und Keimlinge	35
8.1	Extraktion der Methanol-löslichen Inhaltsstoffe	35
8.2	Analyse Zellwand-gebundener Inhaltsstoffe	35
8.2.1	Zellwandpräparation	35
8.2.2	Alkalische Hydrolyse der Zellwände bei 80°C	36
8.2.3	Saure Hydrolyse der vorbehandelten Zellwände bei 100°C	36
8.3	Extraktion phenolischer Inhaltsstoffe aus dem Medium	36
8.4	Analytik phenolischer Inhaltsstoffe mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	37
9.	Ligninnachweis und -Quantifizierung in Fichten-Suspensionskulturen und Keimlingen	38
9.1	Nachweis als Lignin-Thioglycolsäure-Derivate	38
9.2	Nachweis mit Phloroglucinol/HCl	39
9.3	Histochemische Nachweise	39
10.	Charakterisierung des extrazellulären Polymers	40
10.1	Thioacidolyse	40
10.1.1	Thioacidolyse (Schritt 1)	40
10.1.2	Desulfurierung der Thioacidolyseprodukte (Schritt 2)	39
10.1.3	Analyse der Thioacidolyseprodukte mittels Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)	41
10.1.4	Zuordnung der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten	42
10.2	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)	50
10.3	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)	50
10.4	Elementaranalyse	50
10.5	Zuckeranalyse	51
10.6	Aminosäureanalyse	53
10.7	Gelpermeationschromatographie (HPSEC)	53
11.	Analyse des Peroxidase-Isoenzymusters	54
11.1	Proteinextraktion	54
11.2	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	56
11.2.1	Gelapparatur	56
11.2.2	Gelzusammensetzung	57
11.2.3	Auftrennung der Isoenzyme	58
11.3	Bestimmung des Isoelektrischen Punktes	58
11.4	Quantitativer Nachweis der Peroxidase-Aktivität im Gel	59
12.	Inhibition von Peroxidasen und Laccasen	60
13.	<i>In vitro</i> -Synthese von Ligninen (Dehydrierungspolymerisate; DHPs)	60

14.	Messung von Enzymaktivitäten	62
14.1	Proteinextraktion	62
14.2	Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD)	63
14.3	Peroxidase (POD)	63
15.	Untersuchungen zum Bindungstyp von 3,4-Dichloranilin (DCA) in Dehydrierungspolymerisaten (DHPs)	64
15.1	Einbau von 3,4-Dichloranilin und [^{15}N]Anilin in DHPs	64
15.2	Synthese von Modellsubstanzen	67
15.2.1	Reinigung von 1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)propan-1,3-diol	67
15.2.2	Synthese von 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dichlorphenylamino)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1-ol	68
15.2.3	Synthese von [^{15}N] 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylamino)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1-ol	70
15.2.4	Synthese von N-(3,4-Dichlorphenyl)-N-iminoprop-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-en	71
15.3	Reinigung der Syntheseprodukte mittels präparativer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	72
15.4	Charakterisierung der Syntheseprodukte	73
15.4.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Dioden-Array-Detektion	73
15.4.2	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)	74
15.4.3	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)	75
16.	Hydrolysekinetik und pH-Stabilität der Bindungen von Anilinen in DHPs und Modellsubstanzen	75

III. ERGEBNISSE

1.	Induktion der Ligninbildung in Fichten-Suspensionskulturen mit einem <i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> -Elicitor	77
1.1	Ligninbildung in Zellwänden und Kulturmedium	77
1.2	Charakterisierung des extrazellulären Polymers	79
1.2.1	Löslichkeit	79
1.2.2	Thioacidolyse und Desulfurierung	80
1.2.3	^1H -Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie	83
1.2.4	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)	85
1.2.5	Elementaranalyse	87
1.2.6	Aminosäureanalyse	88
1.2.7	Kohlenhydratanalyse	89

1.2.8	Gelpermeationschromatographie	90
1.2.9	Alkalische und saure Hydrolyse	92
1.3	Untersuchungen zur Biosynthese des extrazellulären Polymers	93
1.3.1	Dehydrierungspolymerisate als Modellsysteme	93
1.3.2	Auswirkung der Elicitorbehandlung auf die Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe	97
1.3.3	Auswirkung der Inhibition von Peroxidasen und Laccasen auf die Akkumulation von Zwischenprodukten der Lignin-Biosynthese	102
1.3.4	Auswirkung der Elicitorbehandlung auf die Peroxidase-Aktivität	104
1.3.5	Auswirkung der Elicitorbehandlung auf das Peroxidase-Isoenzymmuster	105
2.	Auswirkung von Ozon auf die Biosynthese phenolischer Polymere in Fichten-Keimlingen	108
2.1	Makroskopische Reaktionen der Keimlinge	108
2.2	Lignin- und Suberinakkumulation	110
2.2.1	Quantifizierung phenolischer Polymere nach der LTGA-Methode	110
2.2.2	Histochemische Lokalisierung phenolischer Polymere	111
2.2.3	Untersuchungen zur Ligninstruktur	113
2.3	Ozoneffekt auf die Aktivitäten von Enzymen der Ligninbiosynthese	115
3.	Untersuchungen zum Bindungstyp von 3,4-Dichloranilin in Dehydrierungspolymerisaten (DHPs)	119
3.1	Synthese und Charakterisierung der DHPs	119
3.1.1	Molekulargewichtsverteilung	119
3.1.2	Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie	120
3.2	Synthese und Charakterisierung von Modellsubstanzen	130
3.2.1	Charakterisierung der Edukte	130
3.2.2	Charakterisierung der Modellsubstanzen	141
3.2.3	Zuordnung der Bindungstypen von 3,4-Dichloranilin und [¹⁵ N] Anilin in DHPs	154
4.	Untersuchungen zur chemischen Stabilität der Bindungen von Anilinen in DHPs und Modellsubstanzen	159

IV. DISKUSSION

1.	Elicitor-induzierte Lignifizierung in Fichten-Suspensionskulturen	166
1.1	Ligninstruktur	167
1.2	Der Lignin-Extensin-Komplex	171
1.3	Lignin-Biosynthese	172

INHALT	V
2. Biosynthese phenolischer Polymere in Ozon-behandelten Fichten-Keimlingen	176
2.1 Akkumulation von Lignin und Suberin	176
2.2 Induktion von Enzymen der Lignin-Biosynthese	177
3. Bindungstyp von 3,4-Dichloranilin (DCA) in Dehydrierungspolymerisaten (DHPs) und Hydrolyseempfindlichkeit dieser Bindung	179
3.1 Der Bindungstyp von DCA in DHPs	179
3.2 Hydrolyse-Stabilität der Bindung von DCA in DHPs	183

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassung	187
-----------------	-----

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis	189
----------------------	-----

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampère (Einheit der Stromstärke)
Ac	Acetyl-Gruppe
AGP	Arabinogalactan-Proteine
atm	Atmosphären (Einheit des Drucks)
bar	Bar (Einheit des Drucks)
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
°C	Grad Celsius (Einheit der Temperatur)
4-CA	4-Chloranilin
CAD	Zimtalkohol-Dehydrogenase
cm	Zentimeter (Einheit der Länge)
CAS	Chemical Abstracts
CoA	Coenzym A
COLOC	Kopplungs-Korrelation über mehrere Bindungen (NMR-Spektroskopie)
COSY	Korrelierte NMR-Spektroskopie
cpm	Zahl der registrierten (Zerfalls-) Ereignisse pro Minute
d	Tage (Einheit der Zeit)
DCA	3,4-Dichloranilin
DDT	1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2,2-trichlorethan
DHP	Dehydrierungspolymerisat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zahl der tatsächlichen (Zerfalls-) Ereignisse pro Minute
DTE	Dithioerythritol
E	Extinktion
ECL	Extrazelluläres ligninartiges Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Et	Ethyl-Gruppe
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
GRP	Glycin-reiche Proteine
H	<i>p</i> -Hydroxyphenyl-Rest
h	Stunden (Einheit der Zeit)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPSEC	Hochleistungs-Gelpermeationschromatographie
HRGP	Hydroxyprolin-reiche Glycoproteine
Hz	Hertz (Einheit der Frequenz)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
INEPT	Polarisationstransfer-Methode (NMR-Spektroskopie)
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
J	Kopplungskonstante (NMR-Spektroskopie)
K	Kelvin (Einheit der Temperatur)
Karst.	Karsten (Autor der Pflanzensystematik)
kg	Kilogramm (Einheit des Gewichts)
L.	Linné (Autor der Pflanzensystematik)
l	Liter (Einheit des Volumens)
LTGA	Lignin-Thioglycolsäure-Derivate
Me	Methyl-Gruppe

Fortsetzung I Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
M	Molar (Einheit der Stoffmenge)
MeOH	Methanol
μE	Mikrocinstein (Einheit der Lichtintensität)
μg	Mikrogramm (Einheit des Gewichts)
μl	Mikroliter (Einheit des Volumens)
μmol	Mikromol (Einheit der Stoffmenge)
mg	Milligramm (Einheit des Gewichts)
mkat	Millikatal (Einheit der Enzymaktivität)
ml	Milliliter (Einheit des Volumens)
mM	Millimolar (Einheit der Stoffmenge)
mm	Millimeter (Einheit der Länge)
MS	Massenspektrometrie
M/z	Masse/Ladungs-Verhältnis (Massenspektrometrie)
NADP	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
nl	Nanoliter (Einheit des Volumens)
nm	Nanometer (Einheit der Länge)
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (NMR-Spektroskopie)
<i>p</i>	<i>para</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
pI	Isoelektrischer Punkt
POD	Peroxidase
ppm	parts per million (Einheit der chemischen Verschiebung (NMR-Spektroskopie))
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPRP	Repetitive Prolin-reiche Proteine
Rt	Retentionszeit (HPLC)
S	Siemens (Einheit der Leitfähigkeit)
s	Sekunde (Einheit der Zeit)
SA	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
t	Tonnen (Einheit des Gewichts)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl-Gruppe
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	ubiquitäre (radioaktive Markierung)
UV	ultraviolette (Strahlung)
V	Volt (Einheit der Spannung)
v	Volumen
VIS	sichtbare (Strahlung)
W	Watt (Einheit der Leistung)
w	Gewicht
ZA	Zählabschaltung

I. EINLEITUNG

1. Aufbau pflanzlicher Zellwände und Bedeutung der Lignine

1.1 Chemische Zusammensetzung der Zellwände

Die primäre Zellwand

Die Entwicklung der Pflanzenzellwand beginnt während der Zellteilung mit der Bildung der Zellplatte durch seitliches Zusammenfließen von Golgi-Vesikeln an der Grenze zweier Tochterzellen. Die Zellplatte enthält keine Gerüstfibrillen, sie besteht vorwiegend aus stark gequollenen Pektinen mit einem geringen Protein-Anteil. Unmittelbar nach der Zellteilung beginnt jede der beiden Tochterzellen mit der Abscheidung von Wandlamellen, die nun auch Cellulose-Gerüstfibrillen enthalten. Dadurch entsteht die Primärwand (Ziegler 1991). Die pflanzliche Primärwand muß einer Vielzahl widersprüchlicher Anforderungen gerecht werden. Sie bildet einerseits eine Grenze und Barriere, ist aber auch Kommunikationsraum und Verbindung zwischen den Nachbarzellen. Deshalb muß sie flexibel und gleichzeitig stabil sein. Ihre Struktur muß beim Wachstum ständig verändert werden können. Dabei darf sie nicht massiv gebaut sein, sondern muß so weitmaschig angelegt werden, daß neben Wasser auch Ionen und kleinere Proteine leicht eindringen und passieren können. Die Zellwand muß auf Signale, beispielsweise Wachstumshormone oder Licht, rasch und präzise in ihren Eigenschaften verändert werden können, ohne daß ihre Stabilität gefährdet wird.

Den vielfältigen Anforderungen entsprechend ist der strukturelle Aufbau der pflanzlichen Zellwand äußerst komplex, und bis heute existiert kein allgemein anerkanntes Modell für ihren molekularen Aufbau. Für Stütz- und Strukturgewebe scheint in der Natur immerhin ein allgemeines Prinzip zu gelten. Diesem Prinzip entsprechend wird eine reißfeste, fibrilläre Substanz in eine amorphe Matrix eingebettet. Bei Pflanzen handelt es sich dabei um Cellulosefibrillen, die von einer Matrix aus langkettigen Polysacchariden und Proteinen eingeschlossen werden. Es gibt vier chemisch und ultrastrukturell sehr unterschiedliche Hauptkomponenten primärer Zellwände: Cellulose, Hemicellulosen, Pektine und Proteine.

Cellulose ist ein Bestandteil von Zellwänden aller höheren Pflanzen (Ziegler 1991). Sie besteht aus $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpften D-Glucoseeinheiten mit Polymerisationsgraden von 2000 bis 15000, die unverzweigt als Kette angeordnet sind. Während der Biosynthese assoziieren die Glucanketten unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken spontan zu Mikrofibrillen. In solchen ebenfalls bandförmigen Gerüstfibrillen bestehen über weite Bereiche kristallgitterartige Ordnungen. Die Mikrofibrillen bilden die Hauptkomponente der Primärwand und machen 20 bis 30 % des Trockengewichts aus. Sie sind verantwortlich für die große Reißfestigkeit

pflanzlicher Zellwände. Die Zugbelastbarkeit von Cellulosefibrillen liegt nur wenig unter der von Stahl (14-20 kg-mm⁻²; Stahl: 25 kg-mm⁻²; Cassab und Varner 1988).

Bei den Hemicellulosen handelt es sich um die Zellwand-Fraktion mit der größten gattungsspezifischen Variabilität bezüglich ihrer Zusammensetzung (Fry 1988; Bacic et al. 1988). In dicotylen Pflanzen bilden Xyloglucane die Hauptkomponente der Hemicellulosen. Sie bestehen aus $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpften D-Glucoseeinheiten, von denen die Mehrzahl $\alpha(1\rightarrow6)$ -gebundene D-Xylose-Seitenketten tragen. Die Seitenketten können um L-Fucose, D-Galactose und L-Arabinose erweitert sein. Die Xylane oder Glucuronoarabinoxylane bilden die wichtigste Hemicellulosekomponente der Gräser. Ihre langen $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpften D-Xylose-Ketten tragen Seitenketten aus D-Glucuronsäure, deren 4-O-Methylether und L-Arabinose. Die $\beta(1\rightarrow3,1\rightarrow4)$ -D-Glucane kommen wahrscheinlich nur in den Zellwänden der Monocotyledonen vor, insbesondere bei den Gräsern. Bei diesen unverzweigten Glucosepolymeren liegen zwischen zwei 1 $\rightarrow$ 3-Bindungen mehrere 1 $\rightarrow$ 4-gebundene D-Glucoseeinheiten. Ein weiterer Bestandteil der Hemicellulosen ist die Callose. Dieses Polymer enthält nahezu ausschließlich $\beta(1\rightarrow3)$ -verknüpfte D-Glucose und kommt an Siebporen des Phloems, als Abgrenzungsschicht bei der Bildung des Sporoderms von Pollenkörnern und in Pollenschläuchen vor (Strasburger 1991).

Die Pektine umfassen eine heterogene Gruppe verzweigter, stark hydratisierter Polysaccharide, die unter milden Bedingungen mit Oxalat oder Chelatoren aus der Zellwand herausgelöst werden können (Jarvis 1984). Das offensichtlich allen Pektinen eigene Rhamnogalacturonan-„backbone“ besteht aus $\alpha(1\rightarrow4)$ -verknüpften D-Galacturonosyl- und $\alpha(1\rightarrow2)$ -verknüpften L-Ramnosylmolekülen (Bacic 1988). Diese Bereiche weisen eine „Block“-Struktur auf, in der lange ununterbrochene Bereiche aus unverzweigten $\alpha(1\rightarrow4)$ -verknüpften D-Galacturonsäure-Molekülen oder deren Methylester mit stark verzweigten Bereichen, die auch weitere Zucker enthalten (L-Rhamnose, L-Arabinose, L-Fucose und weitere), abwechseln. Die D-Galacturonsäureketten können über ihre Carboxylgruppe zweiwertige Ionen (Calcium, Magnesium) binden und so Netzwerke bilden (Fry 1988). An das Rhamnogalacturonan-Gerüst sind kovalent verschiedene, meist neutrale Seitenketten wie Rhamnogalacturonane, Polygalacturonsäureester, Arabinane, Galactane und Arabinogalactane gebunden.

Bereits 1960 fanden Lamport und Northcote erste Hinweise auf ein Strukturprotein in primären Zellwänden einer *Acer pseudoplatanus*-Zellkultur. Es wurde angenommen, daß dieses Protein mit Wachstum und Dehnung (engl. *extension*) primärer Zellwände zusammenhängt. Aus diesem Grunde setzte sich dafür später der Name „Extensin“ durch. Dieses Molekül enthält einen hohen Anteil Hydroxyprolin und ist, wie später gezeigt wurde (Lamport 1967), O-glykosidisch an Kohlenhydrate gebunden. Seitdem wurde eine Vielzahl Extensin-

ähnlicher Proteine gefunden. Da deren Funktion bisher noch nicht geklärt ist, werden sie besser als **HRGPs** (engl. **hydroxyproline rich glycoproteins**) bezeichnet. Von den HRGPs werden vier weitere Proteinklassen der Zellwand unterschieden: **Glycin-reiche Proteine (GRPs)**, die **repetitiven Prolin-reichen Proteine (RPRPs)**, **Arabinogalactan-Proteine (AGPs)** und die **Lectine der Solanaceen** (Showalter 1993). Mit Ausnahme der GRPs zeichnen sich alle diese Strukturproteine durch stark repetitive Aminosäuresequenzen mit hohem Gehalt an Prolin oder Hydroxyprolin aus. Die HRGPs stehen unter strenger Kontrolle im Entwicklungsprozeß und werden organ- und zustandsspezifisch gebildet. Bei Verwundung, Abwehr von Schadorganismen und anderen Streßsituationen reagieren viele Pflanzen mit einer vermehrten Produktion von HRGPs (Bradley et al. 1992). Als Proteine mit vielen Tyrosinresten, die freie Hydroxylgruppen tragen, verfügen die HRGPs über eine Fülle von Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Zellwandpolymeren (Lampert 1967; Whitmore 1978; Cooper und Varner 1984).

Die sekundäre Zellwand

Eine Vielzahl von Zellen übernimmt im Gesamtorganismus spezielle Funktionen, die eine große Stabilität erfordern. Diese Festigkeit wird durch Ausbildung einer **Sekundärwand** gewährleistet. Sekundäre Wandschichten werden nach Abschluß des Zellwachstums der primären Zellwand von innen her angelagert (Ziegler 1991). Besonders bei größeren Landpflanzen werden für Festigungsgewebe zwei spezialisierte Zelltypen ausgebildet: **Faserzellen** für Zugbelastungen und **verholzte Zellen**, um einem äußeren Druck widerstehen zu können. Die massiven sekundären Verdickungsschichten der Wände von Faserzellen bestehen überwiegend aus dichtgepackten Mikrofibrillen der Cellulose. Druckfeste Zellwände ergeben sich dadurch, daß die Gerüstfibrillen zusätzlich in formfeste Materialien eingepackt werden. Als solche Inkrusten treten neben Mineralsalzen (Silicate, Calciumcarbonat) vor allem **Lignine** (lat. *lignum*, Holz) auf, deren Einbau in die Zellwand zur Verholzung führt. Lignine entstehen in der lignifizierenden Zellwand durch Polymerisation aus den entsprechenden Hydroxymethylalkoholen. Die nach allen Raumrichtungen wachsenden Makromoleküle von Lignin durchwuchern das Mikrofibrillengerüst der Zellwände. Verholzte Zellwände bestehen bis zu 30 % aus Ligninen. Die Cellulosefibrillen werden im Verlauf der Verholzung schließlich so dicht in Lignine eingepackt, daß sie sich nicht mehr gegeneinander verschieben können und ihre an sich schon sehr begrenzte Quelfähigkeit verlieren.

1.2 Architektur der Zellwände

Die Primärwände

Das erste umfassende Modell primärer Zellwände wurde 1975 von Albersheim vorgestellt.

Nach Ansicht des Autors sollten mit Ausnahme der Cellulose-Xyloglucan-Bindung sämtliche Zellwandbestandteile kovalent miteinander verknüpft sein und ein entsprechend festgefügtes Netzwerk bilden. An dieses seien die Cellulosefibrillen über Wasserstoff-Brückenbindungen angehängt. Diese sollten beim Zellwachstum teilweise gelöst werden und dadurch die Xyloglucanketten beweglich machen, was eine Parallelverschiebung benachbarter Cellulose-Mikrofibrillen ermöglicht („Kriech- oder Gleitmechanismus“).

Lamport und Epstein (1983) präsentierten ein anderes Modell. Demnach sollten längs angeordnete Cellulosefibrillen über Extensinmoleküle miteinander quervernetzt sein. Verbindungen kämen zustande, indem Tyrosinreste durch Peroxidasen zu Isodityrosin verknüpft würden. Aussagen über die genaue Anordnung der Zellwandbestandteile wurden von den Autoren allerdings nicht gemacht.

Fry (1989) entwickelte ein Modell, bei dem im Zusammenspiel mit modifizierenden Enzymen den Xyloglucanen eine entscheidende Bedeutung bei Elongationsprozessen zugewiesen wurde. Xyloglucanmoleküle bestehen Fry zufolge aus drei funktionellen Bereichen: Die vorderen und hinteren Abschnitte binden an unterschiedliche Mikrofibrillen, während der Mittelteil mit weiteren Zellwandpolymeren über Hydroxyzimtsäure-Brücken verknüpft ist. Die Mittelteile der Xyloglucanketten würden bei Bedarf enzymatisch gespalten und erreichten damit eine gewisse Dehnbarkeit. Tatsächlich ist ein solches Enzym, die Endo- β -Glucanase, schon länger bekannt (Edwards et al. 1986). Auch die postulierten Verknüpfungen mittels Ferulasäure und *p*-Cumarsäure, wie auch deren Ester wurden bei Mono- und Dicotylen nachgewiesen. Probleme bereiten allerdings experimentelle Befunde, daß Pflanzen auch ohne Hemi-cellulose und Cellulose funktionsfähige Zellwände ausbilden (Talbot und Ray 1992).

Die Idee, daß die Makromoleküle der Zellwand nur zu einem sehr geringen Teil kovalent miteinander verknüpft sind und als voneinander unabhängige Netzwerke die Zellwand aufbauen („Multi-Netzwerk-Gel“-Modell), wird seit Beginn der achtziger Jahre diskutiert (Jarvis 1984). Es gäbe, nach Untersuchungen von McCann und Roberts (1991), die einzelne Zellwandbestandteile mittels Gefrierätz-Technik unmittelbar sichtbar machen, mindestens zwei nebeneinander existierende, aber voneinander unabhängige Netzwerke: ein Hemi-cellulose-Cellulosefibrillen-Netzwerk und ein Pektin-Netzwerk (Abb. 1). Die Mikrofibrillen werden durch Hemicelulosen quervernetzt. Die Pektinfraktion besteht aus zwei Fraktionen: Die Pektine der Mittellamelle sind über Calciumbrücken miteinander verknüpft und sorgen für den Zell-Zell-Zusammenhalt. In der restlichen Zellwand legt ein Netzwerk aus veresterten Pektinen die Porosität, die „Maschenweite“, fest. Die Pektine liegen dabei teilweise als Gel vor.

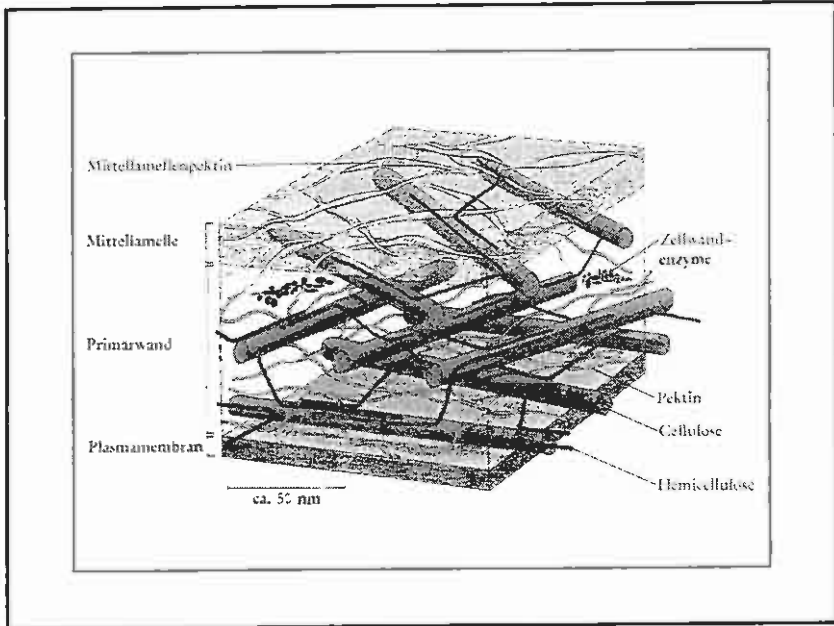


Abb. 1. Architektur der pflanzlichen primären Zellwand (nach Mc Cann und Roberts 1991; Schindler 1993). Abgebildet ist ein hypothetisches Modell der Anordnung verschiedener Zellwandpolymere in den Zellwänden des Zwiebelparenchyms. Strukturproteine wurden nicht in das Schema aufgenommen, da die Zellwände der Zwiebel sehr wenig Protein enthalten.

Sekundäre Zellwände

Die Apposition sekundärer Wandschichten erfolgt schubweise. Es entstehen Lamellen, die als Sekundärwandschichten bezeichnet werden. Nachdem Primärwandschichten an die Mittellamelle angeheftet wurden, folgt zunächst die vergleichsweise dünne Sekundärwandschicht (S 1). Ihr folgt nach innen die dickere S 2-Schicht, die aus über 50 Wandlamellen bestehen kann. Gegen das Zellumen hin wird als letzte Lage eine dünne S 3-Schicht (Tertiärwand) abgelagert (Strasburger 1991). Die Sekundärwandschichten enthalten als wichtige Inkrusten auch Lignine. Bei den Sekundärwandstrukturen haben kovalente Verknüpfungen verschiedener Zellwandbestandteile eine große Bedeutung. An einer solchen Vernetzung der einzelnen Bausteine der Zellwände sind neben den Polysacchariden Hydroxyzimtsäure-Dimere (Fry und Miller 1989; Hanley et al. 1993; Turner et al. 1993), Proteine (Fry 1986; Bradley et al. 1992; Showalter 1993) und Lignine (Scalbert et al. 1986; Bacic et al. 1988; Lam et al. 1990; Ralph et al. 1992) beteiligt (Abb. 2 B).

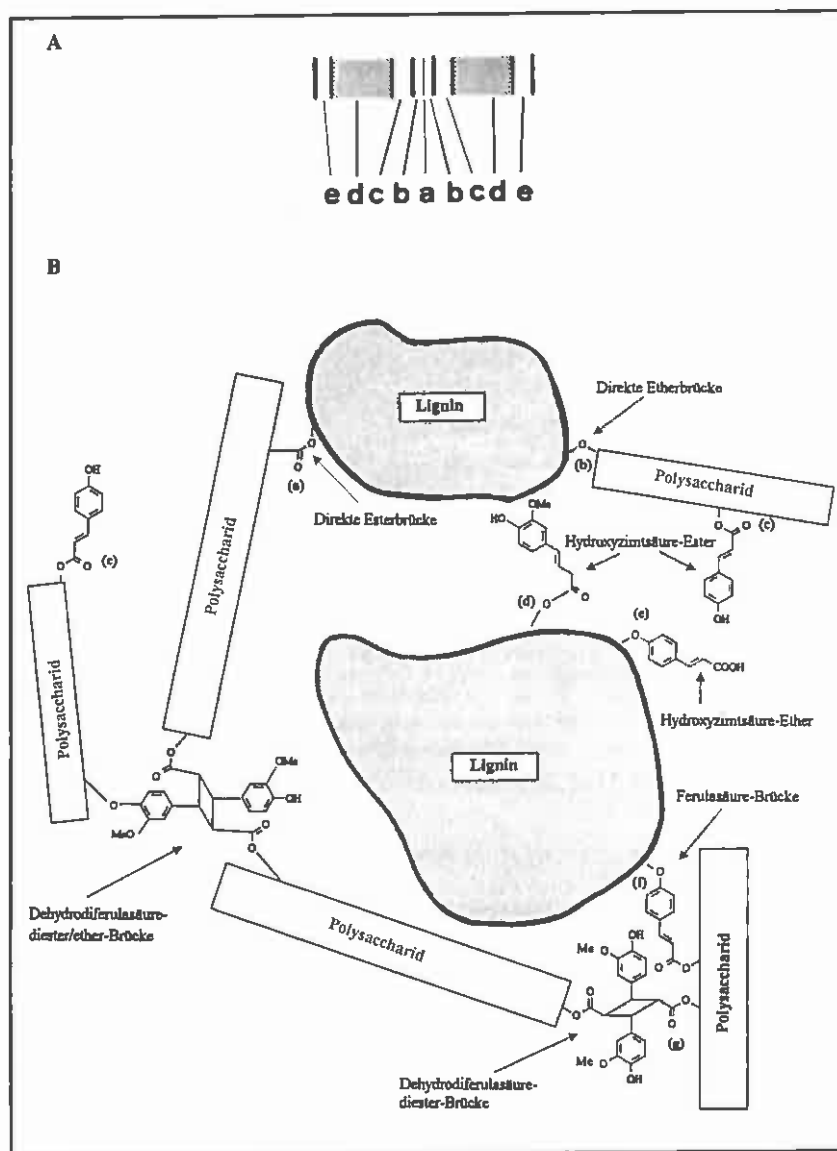


Abb. 2. (A) Anordnung sekundärer Wandschichten (aus Ziegler 1991). a, Mitellamelle; b, Primärwand; c, S1-Schicht (Übergangslamelle), d, S2-Schicht (eigentliche Sekundärwand); e, S3-Schicht (Tertiärwand). (B) Schema für die kovalente Quervernetzung zwischen Polysacchariden, Hydroxyzimtsäuren und Ligninen (verändert nach Iiyama et al. 1994).

Während der Lignifizierung verdrängt das hydrophobe Lignin Wasser aus den Zellwänden. Die an sich schon äußerst festen Cellulose-Mikrofibrillen werden von einem wasserundurchlässigen phenolischen Polymer inkrustiert, daß die Zellwände impermeabel werden läßt und weitere mechanische Stützfunktionen übernimmt. Es wird angenommen, daß die Quervernetzung von Lignin mit Zellwand-Polysacchariden über drei Typen von Bindungen ermöglicht wird: Erstens bestünden direkte Esterbindungen zwischen Uronsäuren (Pektinen) und freien Hydroxylgruppen von Monolignol-Seitenketten des Lignins (Lam et al. 1990). Die zweite Bindungsart wären direkte Etherbindungen zwischen Polysacchariden und Lignin (Lam et al. 1990). Als dritte Möglichkeit der Quervernetzung kämen Bindungen von Lignin an Polysaccharide über Hydroxyzimtsäureester- oder -ether-Brücken in Frage (Scalbert et al. 1986; Bacic et al. 1988; Lam et al. 1990).

2. Biosynthese der Lignine

Aufbau der Grundstrukturen

Die Monolignole, wie die monomeren Vorstufen des Ligninpolymers genannt werden, entstehen in höheren Pflanzen über den Shikimat-Weg, aus dem die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan hervorgehen (Davin und Lewis 1992; Abb. 3). Die oxidative Desaminierung von Phenylalanin zu trans-Zimtsäure wird von der **Phenylalanin-Ammoniak-Lyase** (PAL) katalysiert (Abb. 3, Reaktionsschritt [1]). Die PAL fungiert als Schlüsselenzym an dieser biosynthetischen Abzweigung vom Primärstoffwechsel in den Sekundärstoffwechsel der phenolischen Naturstoffe. In Gräsern ist eine analoge Reaktion von Tyrosin zu *p*-Cumarsäure bekannt, die von der **Tyrosin-Ammoniak-Lyase** gefördert wird. Ansonsten entsteht *p*-Cumarsäure über die Hydroxylierung von Zimtsäure durch eine mikrosomale **Zimtsäure-4-Hydroxylase** [2]. Durch Hydroxylierungen (*p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase [3a]; Ferulasäure-5-Hydroxylase [4a] und Methylierungen (durch **O-Methyltransferasen** [5]) entstehen Hydroxyzimtsäurederivate, die mittels **Cinnamoyl-CoA-Ligase** [6] in ihre aktivierte Form, die CoA-Ester überführt werden (Weg 1). Diese Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen können auch auf der Stufe der CoA-Ester stattfinden (Weg 2). Das für die Hydroxylierung in 3-Position benötigte Enzym wird als *p*-Cumaroyl-CoA-3-Hydroxylase (Kneusel et al. 1989; [3b]) bezeichnet. Die nachfolgende Methylierung wird durch die **Caffeoyl-CoA-3-O-Methyltransferase** [5a] (Pakusch et al. 1989; Kühnl et al. 1989) katalysiert. **Feruloyl-CoA-5-Hydroxylase** [4b] und **5-Hydroxyferuloyl-CoA-Methyltransferase** [5b] sind allerdings bisher nicht beschrieben. Durch kombinierte Aktion von **Cinnamoyl-CoA:NADP-Oxidoreduktase** [7] und **Zimtalkohol-Dehydrogenase** [8] entstehen aus den über Weg 1 und Weg 2 gebildeten CoA-Estern die entsprechenden Alkohole. Für den Transport der als Monolignole bezeichneten Hydroxyzimtalkohole aus dem Cytoplasma zum Syntheseort des Lignins in der Zellwand werden zwei

Alternativen diskutiert: Zum einen könnten die Ligninvorstufen in Vesikel eingeschlossen zur Zellwand befördert und dort mittels Membranfusion wieder freigesetzt werden (Pickett-Heaps 1968). Zum anderen wäre eine Glucosidierung für die Überführung der Monolignole in eine Transportform möglich. Eine in der Zellwand lokalisierte β -Glucosidase würde daraus die Alkohole als direkte Lignin-Vorstufen freisetzen (Freudenberg 1965; Grisebach 1981).

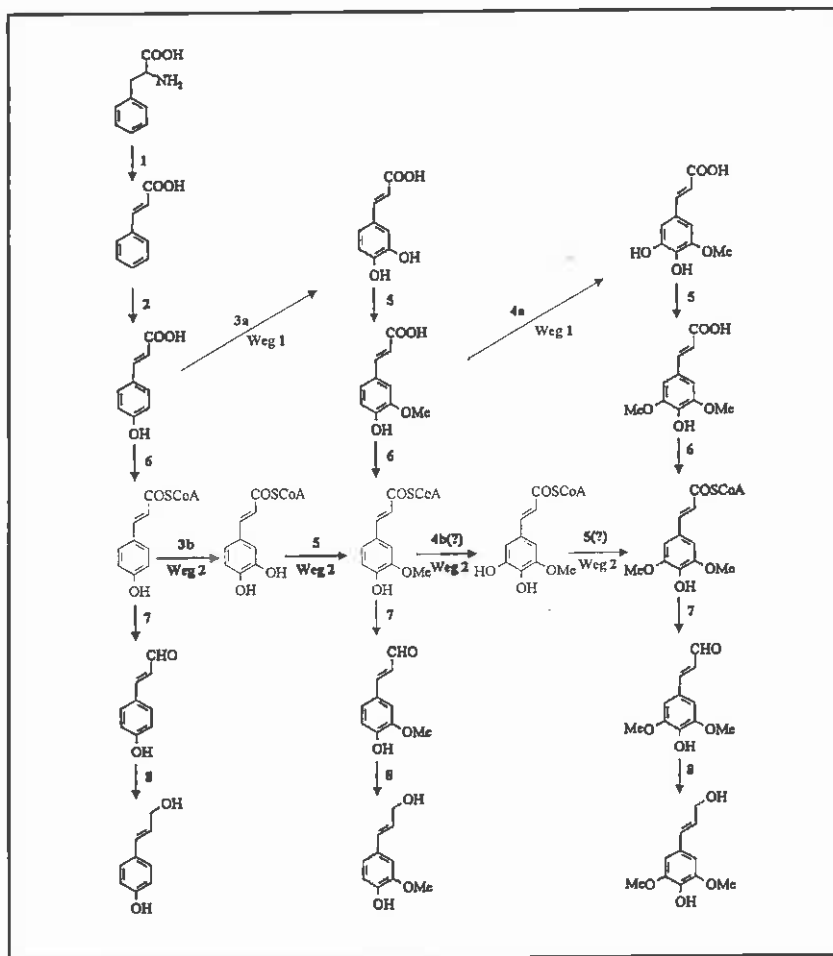


Abb. 3. Biosynthese der Monolignole (verändert nach Davin und Lewis 1992). Die Existenz eines zweiten Weges für bestimmte Hydroxylierungs- und Methylierungsschritte auf der Ebene der Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester (Kneusel et al. 1989; Pakusch et al. 1989; Kühnl et al. 1989) ist berücksichtigt.

Dehydrierungspolymerisation von Monolignolen zu Ligninen

Für die Polymerisation der Monolignole kommen zwei enzymatische Mechanismen in Frage (Freudenberg 1968; Sederoff et al. 1994): 1. Unter dem Einfluß von Peroxidasen (PODs) und H_2O_2 wird ein Proton und ein Elektron von der phenolischen Hydroxylgruppe eines Monolignols abstrahiert (Abb. 4). Das dabei entstehende mesomeriestabilisierte Radikal reagiert nun spontan, das heißt ohne enzymatische Steuerung weiter. Die Bindung von Lignin an Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand kann über eine Chinonmethid-Addition erfolgen. Die Reaktion zweier Monoradikale führt in diesem Fall zu einer chinoniden Struktur des einen Ringes. Dadurch wird die benachbarte α -C-H-Bindung reaktiv, sodaß Polysaccharide durch eine Etherbindung kovalent gebunden werden (Freudenberg 1965). 2. Laccasen (*p*-Diphenol: O_2 -Oxidoreduktasen) bzw. Phenoloxidasen (*o*-Diphenol: O_2 -Oxidoreduktasen)

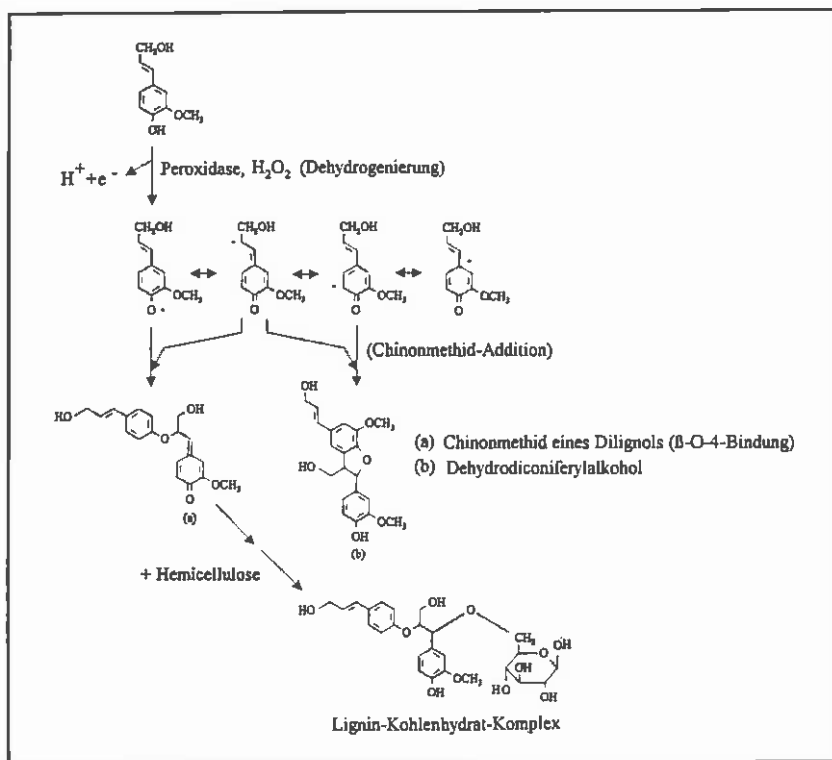


Abb. 4. Verknüpfung der Monolignole im Fichten-Lignin durch Dehydrierungspolymerisation (Katalyse durch Peroxidase) und ihre mögliche Anheftung an Kohlenhydrate (hier: Glucose; verändert nach Richter 1988).

katalysieren die Oxidation phenolischer Substrate mit Hilfe von molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Die weitere Polymerisationsreaktion nach anfänglicher Bildung von Chinonmethiden läuft analog jener bei Peroxidase-Katalyse ab und führt ebenfalls zur Bildung von Ligninen (Freudenberg 1965). Die Rolle beider Enzymklassen bei der Ligninbiosynthese *in vivo* ist bisher nicht eindeutig geklärt (O'Malley et al. 1993).

Die Verknüpfungsmöglichkeiten für die Monomeren bei einer solchen Dehydrierungs-polymerisation sind vielfältig. Die Struktur von einigen dieser Bindungstypen und deren statistische Verteilung im Holzlignin der Fichte sind ermittelt worden (Adler 1977). Aus diesen Daten läßt sich ein Konstitutionsschema formulieren (Abb. 5).

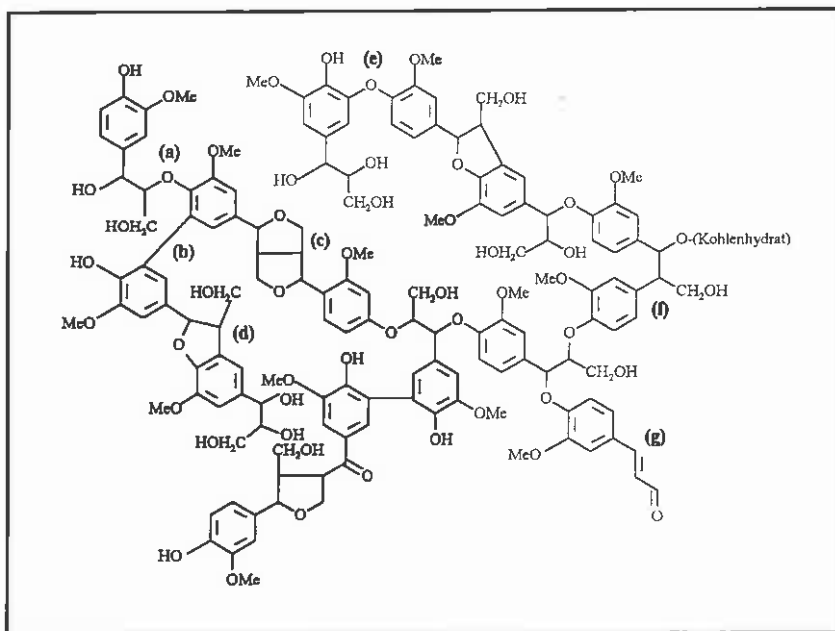


Abb. 5. Formelausschnitt aus einem Konstitutionsschema des Holzlignins von Fichte (nach Adler 1977) mit Angabe der Bindungstypen: (a), β -O-4-; (b), 5-5-; (c) β - β -; (d) β -5-; (e), 4-O-5-; (f), β -1-Struktureinheiten; (g), Coniferylaldehyd-Endgruppe.

3. Strukturelle Variabilität der Lignine

Die strukturellen Eigenschaften der Lignine können Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzenspezies, dem Entwicklungszustand des entsprechenden Gewebes und dem cyto-

gischen Ursprung aufweisen. Diese Variabilität gilt sowohl für die Monolignol-Zusammensetzung als auch für den Anteil der unterschiedlichen Struktureinheiten, die die monomeren Bausteine miteinander vernetzen (Monties 1989). Holzlignine der Gymnospermen werden nahezu ausschließlich aus Guajacyl (G)-Einheiten, die vom Coniferylalkohol als Monolignol stammen, gebildet (ca. 98-99 %). Die Lignine von Angiospermen werden aus einer Mischung von Guajacyl- und Syringyl (S)-Einheiten aufgebaut, von denen sich die letzteren aus dem Monolignol Sinapylalkohol ableiten. Die Lignine der Gräser sind, neben G- und S-Einheiten zusätzlich aus *p*-Hydroxyphenyl (H)-Einheiten aufgebaut, deren Ursprung auf die Verwertung von *p*-Cumarylalkohol als Monomer zurückzuführen ist.

In speziellen Geweben, so z.B. Kompressionsholz, welches bei Nadelbäumen auf der Unterseite horizontal wachsender Äste gebildet wird, treten neben G- die für „normales“ Gymnospermenholz untypischen H-Einheiten auf (Lapierre und Rolando 1988). Auch die Zellwand-Mittellamelle von Gymnospermen und Angiospermen enthält, im Gegensatz zu den später gebildeten Sekundärwand-Schichten, hohe Anteile von H-Einheiten (Whiting und Goring 1982; Sorvari et al. 1986; Terashima und Fukushima 1988; Fukushima und Terashima 1991 b). Whiting und Goring (1982) fanden bei Verwendung verschiedener für die Cellulosegewinnung aus Holz üblicher Chemikalien (Cl_2 , ClO_2 und NaHSO_3) eine unterschiedliche relative Reaktivität von Ligninen aus der Mittellamelle und der Sekundärwand. Als Schlußfolgerung ihrer ausführlichen Studien mit ^3H -markierten H-, G- und S-Hydroxymethylalkoholglucosiden formulierten Terashima und Fukushima (1988) folgende Regeln: 1. H-Einheiten werden vornehmlich in die Mittellamelle der Xylemzellen von Angiospermen und Gymnospermen eingebaut, 2. S-Einheiten sind ein wesentlicher Bestandteil von Geweben der sekundären Zellwand typischer Angiospermen, 3. G-Einheiten werden in beiden Spermatophyten in die Mittellamelle und in sämtliche Sekundärwandschichten, also während der frühen bis zu den späteren Stadien der Zellwand-Differenzierung, inkorporiert.

4. Lignifizierung als Abwehrreaktion höherer Pflanzen

4.1 Die Pflanze -Pathogen-Interaktion

Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung zahlreichen äußeren Reizen und schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Sie dienen herbivoren Tieren als Nahrung, müssen ihren Lebensraum gegen andere pflanzliche Konkurrenten behaupten und führen nicht zuletzt einen permanenten Kampf gegen eine große Zahl und Vielfalt von Schadorganismen, insbesondere phytopathogene Pilze, Bakterien, Viren und Nematoden. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen effiziente Schutz- und Abwehrmechanismen entwickelt, so daß in der Regel nur spezialisierte Mikroorganismen in der Lage sind, Pflanzen erfolgreich zu befallen.

Ein Teil dieses sehr wirksamen Verteidigungssystems ist eine nach Verwundung oder mikrobiellem Befall einsetzende Lignifizierung, die zu einer mechanisch/chemisch verstärkten Zellwand führt. Die induzierte Lignifizierung ist ein wesentlicher Bestandteil der **hypersensitiven Reaktion (HR)** von Pflanzen bei Pathogenbefall. Diese Abwehrreaktion ist charakteristisch für sogenannte nicht kompatible Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Pathogen (**Nicht-Wirt-Resistenz** oder **Rassen-Kultivar-spezifische Resistenz**) und zeichnet sich durch ein sehr schnelles lokal begrenztes Absterben weniger Zellen in unmittelbarer Nähe der Infektionsstelle aus. Die HR ist häufig mit der Akkumulation niedermolekularer Abwehrstoffe (**Phytoalexine**) und einer Lignifizierung um die Infektionsstelle verbunden (Vance et al. 1980; Aist 1983; Hargreaves und Keon 1986; Bolwell 1988; Matern und Kneusel 1988; Stone 1989; Moerschbacher 1989; Walter 1992; Nicholson und Hammerschmidt 1992). Direkt an der Stelle des Eindringens von Pathogenen können sich an der pflanzlichen Zellwand Ausstülpungen (**Papillen**) bilden, die nach histochemischen Untersuchungen vor allem Lignine enthalten (Vance et al. 1980). In verschiedenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die Monomer-Zusammensetzung solcher „Streß“-Lignine deutliche strukturelle Unterschiede zum Polymer in gesundem Gewebe aufweisen kann (Asada und Matsumoto 1972; Ride 1975; Hammerschmidt et al. 1985; Doster und Bostock 1988; Roberts und Svalheim 1990). Eine detaillierte Strukturaufklärung dieser Polymere wurde allerdings in keinem Fall durchgeführt.

4.2 Elicitoren als Auslöser der induzierten Lignifizierung

Pflanzliche Abwehrreaktionen können nicht nur durch Pathogene, sondern auch durch **Elicitoren** ausgelöst werden. Dabei unterscheidet man zwischen biotischen und abiotischen Elicitoren (Yoshikawa 1978). Biotische Elicitoren können zum einen pilzliche Zellwandfragmente sein, die durch hydrolytische Enzyme der Pflanze abgespalten werden (**exogene Elicitoren**) und können zum anderen durch Einwirkung Zellwand-abbauender Enzyme von Pilzen aus der pflanzlichen Zellwand (**endogene Elicitoren**) freigesetzt werden (Ryan 1988). Als biotische Elicitoren wurden bisher Kohlenhydrate, Proteine und Lipide beschrieben (Dixon 1986). Als abiotische Elicitoren bezeichnet man Umweltfaktoren wie UV-Strahlung (Schmelzer et al. 1988), Luftschadstoffe wie Ozon (Sandermann et al. 1994) und Schwefeldioxid (Heller et al. 1990 a), Kälte und Trockenheit (Sondheimer 1961), Schwermetalle (Rouxel et al. 1991), Fungizide (Dercks und Creasy 1989) und Detergentien (Yoshikawa 1978). Viele wichtige Fortschritte bei der Aufklärung pflanzlicher Abwehrreaktionen konnten durch den Einsatz von **Zellkulturen** und Elicitoren als **Modellsystem für Pflanze-Pathogen-Wechselwirkungen** erzielt werden. Suspensionskulturen erleichtern die Untersuchung biochemischer Prozesse, da die Abwehrreaktionen nicht, wie in der intakten Pflanze, lokal beschränkt sind, sondern in der weitgehend homogenen Population der Zellkultur gleichmäßig

aufzutreten. Für viele Pflanzenarten wurde eine weitgehende Übertragbarkeit der Reaktionen im Modellsystem auf die intakte Pflanze gezeigt (Ebel 1986). Eine elicitorinduzierte Lignifizierung wurde bisher für Zellkulturen von *Ricinus communis* (Bruce and West 1989), *Pinus elliotii* (Lesney 1989), *Glycine max* (Graham und Graham 1991) und *Pinus banksiana* (Campbell und Ellis 1992) beschrieben. Auch bei diesen Zellkultur-Ligninen, wie schon für die „Streß“-Lignine von Pflanzen erwähnt, wurde bisher in keinem Fall eine Strukturauklärung unternommen.

5. Lignine als Senke für xenobiotische Chemikalien

Seit etwa 150 Jahren übt die Menschheit durch ihre fortschreitende industrielle Aktivität und den damit verbundenen Verbrauch von Rohstoffesourcen einen wachsenden Einfluß auf die natürlichen Stoffkreisläufe in der Biosphäre aus. Eine besondere Gefahrenquelle stellt die Belastung der Umwelt mit **xenobiotischen Chemikalien** dar. Hutzinger und Veerkamp (1981) verstehen den Begriff „xenobiotisch“ für Chemikalien im Sinne von „für die Biosphäre fremd (d.h. fehl am Platz)“ in direkter und indirekter Folge menschlicher Aktivität. Die zunehmende Freisetzung von Xenobiotika geschah in der Vergangenheit im Vertrauen darauf, daß diese Chemikalien in der Umwelt durch chemische Veränderung, Verdünnung, irreversible Bindung und schließlich endgültigen Abbau (**Mineralisierung**) „entsorgt“ werden. In der Tat können solche Abbauprozesse von Fremdstoffen durch enzymatische Umwandlungen in den damit konfrontierten Organismen (**Metabolismus**), photochemisch in der Atmosphäre und auf Oberflächen (Blatt-, Boden-, Wasseroberfläche), sowie durch mikrobiologischen Abbau (**Biodegradation**) im Bodenbereich und in Gewässern (Korte 1987) bis zu einem gewissen Grad erfolgen. Für eine größere Anzahl von Verbindungen trifft diese Vorstellung jedoch nach heutigem Kenntnisstand so nicht zu. Durch die mit deren chemischer Stabilität (**Persistenz**; z.B. Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKWs), 1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2,2-trichlorethan (DDT) und radioaktive Isotope) verbundenen langen **Halbwertszeiten** und die Anreicherung in der Nahrungskette (**Bioakkumulation**; z.B. DDT, polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Phthalsäureester) erwächst ein potentiellies Risiko für Mensch und Umwelt.

5.1 3,4-Dichloranilin als Umweltchemikalie

Einen wesentlichen Anteil an der Umweltbelastung haben Agrochemikalien, die in großen Mengen direkt in die Umwelt ausgebracht werden. Im Jahr 1991 wurden allein in der Bundesrepublik Deutschland 120427 t Wirkstoffe für Pflanzenbehandlungsmittel produziert (Industrieverband Agrar 1992). Davon wurden in Deutschland in der Zeit von 1989 bis 1991 zwischen 29690 t (1989) und 29670 t (1991) abgesetzt (Tab. 1).

Tab 1. Abgesetzte Wirkstoffmenge in der BR Deutschland in 10³ Tonnen (nach Angaben der Mitgliedsfirmen des Industrieverbandes Agrar e.V. 1992).

Jahr \ Wirkstoff	Herbizide [t]	Fungizide [t]	Insektizide [t]	Andere [t]	Summe [t]
1989	16.54	10.24	1.58	2.33	29.69
1990	15.44	9.96	1.97	2.52	29.89
1991	17.63	8.48	1.26	2.30	29.67

Viele mengenmäßig bedeutende Herbizide enthalten chlorierte Aniline als strukturelle Bestandteile, so z.B. als Acylanilid, N-Phenylharnstoff-, und Carbaminsäurederivate (Worthing und Hance 1987).

Toxikologische Aspekte

3,4-Dichloranilin [RTECS# BX 262500]* (DCA) gilt als sehr giftig und wird von Säugern leicht über Lunge, Haut und Magen-Darm-Trakt aufgenommen. Im Blut kann DCA die Methämoglobinbildung unterstützen. Das Eisen des Hämoglobins ist in diesem Fall dreiwertig und vermag keinen Sauerstoff mehr zu transportieren, was zum Erstickungstod führen kann. Der LD₅₀-Wert von DCA liegt für orale Aufnahme bei 648 mg pro kg Körpergewicht, für dermale Applikation bei 335 mg·kg⁻¹ (Maus). DCA hat ein hohes Allergiepotential und führt bei Inhalation neben schweren Zerstörungen der Schleimhäute zur Ödembildung in der Lunge (Rippen 1984; Lenga 1988). In Soja-Suspensionskulturen wurde ab einer Konzentration von 0.7 mmol pro Liter Kulturmedium eine Hemmung des Zellwachstums beobachtet (Langebartels und Harms 1986).

Noch 1962 nahm man an, daß die Azoverbindung von DCA (3,4,3',4'-Tetrachlorazobenzol), die als Verunreinigung im käuflichen DCA vorkommt, aus Gründen der Molekülgeometrie nicht karzinogen sein kann (Arcos und Arcos 1962). Einige Jahre später wurden ausführliche toxikologische Daten über diese Verbindung erhoben, wobei sich ein ganz anderes Bild ergab. So wie 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin, das als „Seveso-Gift“ traurige Berühmtheit erlangt hat, zeigten die strukturell sehr ähnliche Azo- und auch die Azoxy-Verbindungen von DCA eine hohe toxische Potenz. In *in vitro*-Tests mit Fibroblasten aus Mäuseembryos und Hepatocyten aus Ratten erwies es sich als potentiell onkogen, mutagen und cytotoxisch, beim Ames-Test wurde eine mutagene Wirkung gezeigt und im Kükenembryo-Test Teratogenität festgestellt (Poland et al. 1976).

*) DCA wurde unter der oben angegebenen Nummer in das „Registry of Toxic Effects of Chemical Substances“ des National Institute of Occupational Safety and Health der USA aufgenommen.

5.2 Pflanzliche Entgiftung von Pestiziden

In Säugern kooperieren verschiedene Organe mit unterschiedlichen Zelltypen beim Abbau und bei der Ausscheidung von Fremdstoffen, während einzelne kultivierte Pflanzenzellen für den Metabolismus von Xenobiotika als relativ autonom gelten. Auch spielt die Ausscheidung (z.B. Guttation, Wurzelexudation) von Fremdstoffen, im Gegensatz zu tierischen Organismen, bei Pflanzen nur eine untergeordnete Rolle. Für den Stoffwechsel von Pestiziden in ganzen Pflanzen (Shimabukuro et al. 1982) und pflanzlichen Zellkulturen (Sandermann et al. 1984) hat sich ein dreistufiges Stoffwechselschema bewährt (Abb. 6).

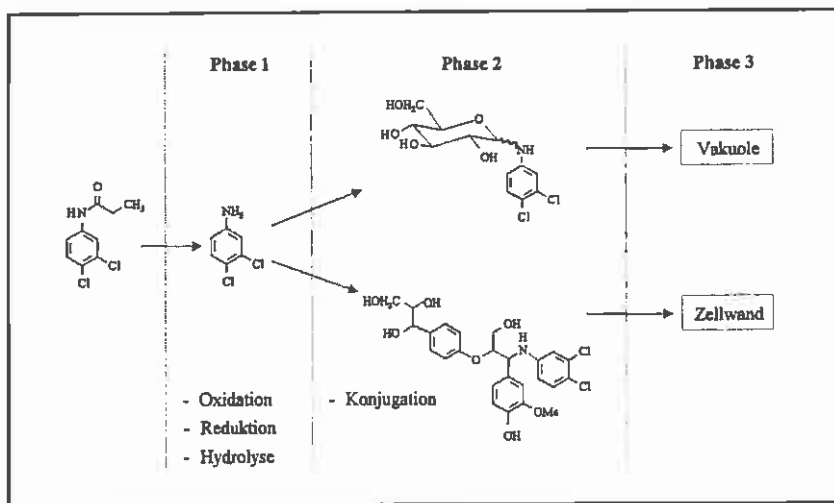


Abb. 6. Stoffwechselschema für den Metabolismus von Pestiziden (hier hypothetisch gezeigt für Propanil) in Pflanzen (verändert nach Sandermann 1987).

Analog dem Stoffwechsel von Säugern kommt es nach Aufnahme und Transport in Phase I zunächst zu Umwandlungsreaktionen wie Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse. In Phase II werden funktionelle Gruppen mit pflanzeigenen Verbindungen verknüpft. Diese Konjugationsreaktionen der Phase II sind meist mit Transport- und Ablagerungsprozessen (Phase III) gekoppelt und sollen im folgenden am Beispiel der Chloraniline erläutert werden.

Pflanzliche Umwandlungsreaktionen wurden sowohl mit Pestiziden, die Chloraniline als strukturelle Bestandteile enthielten, als auch mit freien Chloranilinen durchgeführt. Als Testsysteme fanden dabei ganze Pflanzen, pflanzliche Zellkulturen und *in vitro*-Ansätze Verwendung:

Phase I

Bei der Inkubation von Mikrosomen aus Erbsen mit 4-Chloranilin (4-CA) wurde eine N-Oxidation zur Nitrosoverbindung beobachtet (Lamoureux und Rusness 1986). Eine Inkubation von diversen halogenierten Anilinen und H_2O_2 mit Meerrettich-Peroxidase führte zu den entsprechenden Azoverbindungen (Bartha et al. 1968). Das gleiche Produkt wurde für die Oxidation von 4-CA mit Peroxidasen aus Soja beschrieben (Laurent 1994). Für Monuron (N'-(4-Chlorphenyl)-N-N-dimethylharnstoff) wurde in Baumwolle in geringem Ausmaß eine Arylhydroxylierung mit anschließender Glucosidierung nachgewiesen (Frear et al. 1972).

Phase II

In Reispflanzen wurde die Spaltung von Propanil (N-Propionyl-DCA) und anschließende Bildung von N-Glucosyl-DCA gezeigt (Still 1968). Eine solche N-Glucosidierung von DCA und 4-CA wurde auch mit Enzymextrakten aus Soja (Frear 1968) und Weizen-Zellkulturen (Winkler und Sandermann 1989) nachgewiesen. Bockers et al. (1994) detektierten in Soja-Pflanzen N-Malonyl- und N-Glucosyl-Konjugate von DCA. In Soja-Zellkulturen wurden vor allem die N-Malonyl-Konjugate beider Chloraniline gefunden, welche in das Kulturmedium sekretiert wurden (Winkler und Sandermann 1989). Nach Inkubation von Malonyltransferasen aus Erdnuß-Sämlingen mit DCA erhielten Matern et al. (1984) das entsprechende N-Malonyl-Konjugat. Die N-Glucosyl- und N-Malonyl-Transferasen für chlorierte Aniline wurden von Sandermann et al. (1991) hoch angereichert und charakterisiert.

Phase III

Die Speicherung löslicher und unlöslicher Pestizidkonjugate (Phase III) ähnelt der Speicherung pflanzlicher Naturstoffe. Zahlreiche Flavonoide, besonders solche mit 6-O-(Malonyl)- β -D-glucosyl-Substituenten wurden in Vakuolen lokalisiert (Boller und Wiemken 1986). Dies ist für Pestizidkonjugate erst in einem Fall, nämlich für die vermutlich 6-O-(Malonyl)-substituierten β -D-Glucoside von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), gelungen (Schmitt und Sandermann 1982). Das N-Malonylkonjugat von DCA wurde allerdings auch im Apoplasten der Blätter von intakten Soja-Pflanzen nachgewiesen (Winkler 1991), sodaß ein Transport des Konjugates in den Interzellularraum stattgefunden haben muß. Bei den „unlöslichen“ Pestizidkonjugaten wurde während Phase III die feste Bindung eines größeren Anteils der applizierten Chloranilinmenge als nicht-extrahierbare Rückstände an Zellwandbestandteile nachgewiesen (Kaufman et al. 1976; Sandermann et al. 1983). Die Bedeutung von Ligninen als Senke für Chloraniline im Rahmen der pflanzlichen Entgiftungsreaktion und deren toxikologische Relevanz wird in den nächsten beiden Abschnitten ausführlich dargelegt.

5.3 Bedeutung der Lignine für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände

Für die Untersuchungen nicht-extrahierbarer Rückstände von Pestiziden wurden verschiedene experimentelle Systeme wie ganze Pflanzen, abgeschnittene Blätter, Zellkulturen und Dehydrierungspolymerisate (Copolymere von Coniferylalkohol und Xenobiotika als Modell für Lignine) verwendet. Dabei kommt der operational definierten Ligninfraction (Freisetzung mit Dioxan/2 M HCl 9:1) eine besondere Funktion als Bindungsstelle für Chloraniline zu (Kaufman et al. 1976; Sandermann et al. 1983). Auch die sequentielle Fraktionierung der Zellwand-Bestandteile durch Verdau mit verschiedenen Enzympräparationen und Solventien ergab die Bindung von Chloranilinen an ligninartige Bestandteile (Langebartels und Harms 1988). Einen Überblick über die bisher publizierten Studien, in denen Xenobiotika in Lignin-ähnlichen Fraktionen der Zellwand nachgewiesen wurden, gibt Tab. 2.

Tab. 2. Studien, in denen Lignin-artige Zellwandkomponenten als Bindungsstelle für Pestizide auf der Basis von Chloranilinen beschrieben wurden.

Pestizid	Experimentelles System	Bemerkungen	Literatur
Propanil 3',4'-Dichlorpropionanilid (IUPAC) Buturon 3-(4-Chlorphenyl)-1-methyl-1-(1-methylprop-2-ynyl)harnstoff 3-Chloranilin; 3,4-Dichloranilin	Pflanzen von <i>Oryza sativa</i>	Ligninfraction mit Dioxan/2 M HCl solubilisiert. Seitenkette von Propanil nicht inkorporiert.	[1]
	Pflanzen von <i>Triticum aestivum</i>	Ligninfraction mit Dimethylsulfoxid solubilisiert. Bindung wahrscheinlich nicht kovalent.	[2]
	Pflanzen von <i>Oryza sativa</i>	Ligninfractionen mit Dioxan/H ₂ O und Dioxan/2 M HCl solubilisiert. Charakterisierung der Bindung mittels Pyrolyse-Massenspektrometrie	[3]
3,4-Dichloranilin	Suspensionskulturen von <i>Triticum aestivum</i>	Ligninfraction durch enzymatisch/chemische Zellwandhydrolyse gewonnen	[4]
4-Chloranilin	Suspensionskulturen von <i>Lycopersicon lycopersicum</i> und <i>Zea mays</i>	Ligninfraction durch enzymatisch/chemische Zellwandhydrolyse gewonnen	[5]
3,4-Dichloranilin	Pflanzen von <i>Triticum aestivum</i>	Ligninfraction durch enzymatisch/chemische Zellwandhydrolyse gewonnen	[6]

Literatur: [1], Yih et al. (1968); [2], Haque et al. (1976); [3], Still et al. (1981); [4], Harms und Langebartels (1986); [5], Pogany et al. (1990); [6], Sandermann et al. (1992).

Erste Hinweise auf einen Einbau von DCA in Lignin-artige Zellwandbestandteile erhielten Yih et al. (1968) mit Reis-Pflanzen. In demselben experimentellen System fanden Still et al. (1981) mehr als 40 % des applizierten 3-CA bzw. DCA in isolierten Ligninfractionen der Wurzeln. Mittels massenspektrometrischer Untersuchungen von Fraktionen nach Gelpermeationschromatographie wiesen sie die Bindung beider Chloraniline an das α -C-Atom der

aliphatischen Seitenkette von Phenylpropan-Bruchstücken nach. Eine Benzylamin-Bindung von Chloranilinen an Ligninbestandteile wurde auch von v.d.Trenck et al. (1981) in einem *in vitro*-Lignin, das durch enzymatische Dehydrogenierung von Coniferylalkohol und 4-CA bzw. DCA hergestellt wurde, aufgezeigt. Deren Bildung wurde von den Autoren als kovalente Addition an während der Ligninbiosynthese vermutlich auftretende Chinonmethid-Zwischenstufen erklärt. Haque et al. (1976) zeigten, daß aus nicht-extrahierbaren Rückständen von Buturon in Weizenpflanzen der Wirkstoff und einige Abbauprodukte durch Solvolyse in Dimethylsulfoxid freigesetzt wurden. Wegen des Fehlens geeigneter funktioneller Gruppen in Buturon ist eine kovalente Bindung an Ligninkomponenten unwahrscheinlich. Harms und Langebartels (1986) fanden nach DCA-Applikation an Weizen-Suspensionskulturen ca. 30 % der aufgenommenen Substanz in nicht-extrahierbaren Rückständen. Davon lokalisierten die Autoren nach einer fraktionierten enzymatisch/chemischen Zellwand-Hydrolyse ca. 50 % in einer Lignin-ähnlichen Fraktion. Sandermann et al. (1992) detektierten nach der gleichen Aufarbeitungsmethode ca. 85 % des in nicht-extrahierbaren Rückständen von Weizenpflanzen gebundenen 3,4-Dichloranilins in einer Lignin-ähnlichen Zellwandfraktion. Pogany et al. (1990) untersuchten den Metabolismus von 4-CA in Mais- und Tomaten-Suspensionskulturen. Während in den Tomaten-Zellkulturen kaum Rückstände des Chloranilins auftraten (ca. 7 %), enthielten die Mais-Zellkulturen mehr als 40 % des Xenobiotikums in nicht-extrahierbaren Rückständen und dieses war mit über 40 % im operational definierten Ligninanteil lokalisiert. Neben dem Einbau von Chloranilinen in Lignin-ähnliche Zellwand-Bestandteile wurde bei sämtlichen Publikationen, in denen sequentielle Zellwand-Aufarbeitungsmethoden benutzt wurden, die Lokalisation eines wesentlichen Anteils des Wirkstoffs in polymeren Kohlenhydratfraktionen (z.B. Hemicellulosen oder Pektin) beschrieben.

5.4 Bioverfügbarkeit nicht-extrahierbarer Rückstände von 3,4-Dichloranilin

Zusammenfassende Darstellungen der bisher wenigen publizierten Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit löslicher pflanzlicher Pestizid-Konjugate kommen zu dem Schluß, daß in der Gesamttendenz diese Konjugate im Tier gespalten werden (Esser 1986; Khan et al. 1987). Fast sämtliche Studien wurden mit Ratten durchgeführt. Dabei lag die Ausscheidungsrate im Urin als Maß für die Bioverfügbarkeit der löslichen Konjugate bei 80-100 %. Von nicht-extrahierbaren Pestizidrückständen wurde angenommen, daß diese nur zu einem sehr geringen Anteil im Säugermagen verdaut werden (Harvey 1983; Pillmoor und Roberts 1985; Edwards und Hutson 1986; Khan und Dupont 1987; Akhtar 1987). Im Gegensatz dazu wurde von Sutherland (1976) eine hohe Bioverfügbarkeit (ca. 90 %) eines nicht-extrahierbaren Rückstands von Propanil (3,4'-Dichlorpropionanilid) nach Fütterung an Ratten gefunden. Eine recht hohe Bioverfügbarkeit wurde auch von Khan et al. (1990) für nicht-extrahierbare Rückstände von Deltamethrin (3-(2,2-Dibromethenyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonsäure-

cyano(3-phen-oxyphenyl)-methylester) in Weizengetreide, das an Ratten verfüttert wurde, beschrieben. Sandermann et al. (1990) zeigten die hohe Bioverfügbarkeit (ca. 65 %) von Chloranilinen in *in vitro* Chloranilin-Lignin-Copolymeren, wenn diese an Ratten verfüttert wurden. Aus nicht-extrahierbaren Rückständen von DCA in Weizen wurden 10-20 % der inkorporierten DCA-Menge durch Verdau von Ratten und Schafen freigesetzt. Die Autoren setzten neben Tierversuchen auch eine milde Säurehydrolyse (0.1 M HCl, 37°C) als Simulationsmodell für die Bedingungen im Säugermagen ein. Dabei wurde in zwei Stunden die Freisetzung von ca. 35 % der inkorporierten Radioaktivität aus dem *in vitro*-Polymer und von ca. 10 % aus dem nicht-extrahierbaren Rückstand von Weizen beobachtet. Nach Freisetzung von Chloranilinen aus nicht-extrahierbaren Rückständen in Säugermägen können diese möglicherweise toxische Wirkungen wie die Inaktivierung von Enzymen ausüben (Harvey 1983).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß es bisher keinerlei Hinweise auf einen endgültigen Abbau der Chloraniline in Pflanzen gibt, daß aber das pflanzliche Material allein aufgrund seiner Menge einen bedeutenden Umschlagplatz bzw. eine Senke (engl. „Sink“) für Xenobiotika darstellt (Sandermann 1987). Chloraniline gelangen in Form löslicher und unlöslicher Konjugate zusammen mit den Pflanzen in die natürlichen Stoffkreisläufe der Umwelt (z.B. als Nahrung für Mensch und Tier oder als Substrat für Boden-Mikroorganismen) und können toxisch wirken, sofern kein effektiver Abbau (durch Mikroorganismen des Bodens oder des Darms) bzw. eine Ausscheidung (mit Exkrementen) geschieht.

6. Themenstellung

Struktur und Biosynthese von Elicitor-induziertem Streßlignin

In verschiedenen Untersuchungen wurde in den letzten Jahren nachgewiesen, daß die Strukturen von Ligninen, die nach Verwundung oder mikrobiellem Befall von Pflanzen gebildet werden, sich von den Ligninen in gesundem Gewebe unterscheiden können (Asada und Matsumoto 1972; Ride 1975; Hammerschmidt et al. 1985; Doster und Bostock 1988; Robertsen und Svalheim 1990). Eine detaillierte Strukturaufklärung dieser „Streß“-Lignine wurde allerdings bisher nicht unternommen. Als ein exzellentes Modellsystem, um diese Lücke zu schließen, bot sich eine am Institut kultivierte mixotrophe Fichten-Suspensionskultur an. Meßner und Boll (1993) wiesen in dieser Zellkultur eine stark erhöhte Aktivität verschiedener Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels nach Behandlung mit einer Elicitorpräparation des Fichtenpathogens *Rhizosphaera kalkhoffii* und die Sekretion eines ligninartigen Polymers in das Kulturmedium nach. Ein wesentlicher Vorteil dieses Modellsystems ist die Tatsache, daß das zu untersuchende ligninartige Polymer in das Kulturmedium sezerniert wird und somit aufwendige Isolierungsprozeduren, bei denen labile Bindungen unter Umständen gespalten werden (Ziechmann und Weichelt 1977), unnötig macht.

In einem Vergleichsexperiment sollte untersucht werden, ob ozonbehandelte Fichten-Keimlinge ebenfalls ein Streß-Lignin bilden. Eine Induktion der Aktivitäten verschiedener an der Ligninbiosynthese beteiligter Enzyme unter dem Einfluß einer Ozon-Exposition wurde wiederholt in Pflanzen beschrieben (Kangasjärvi et al. 1994). So wurde in Fichten-Keimlingen eine Ozon-Induktion der Aktivität und der Transkriptmenge von Zimtalkohol-Dehydrogenase nachgewiesen (Galliano et al. 1993 a,b). Eine Analyse der Lignine als möglichem Endprodukt der erhöhten Enzymaktivitäten nach Ozon-Behandlung wurde allerdings bisher in keinem Fall durchgeführt. Neben der Charakterisierung der Lignine aus Fichten-Suspensionskulturen und Keimlingen sollten Untersuchungen zu deren Biosynthese unternommen werden. Mittels sogenannter Dehydrierungspolymerisationen, dies sind *in vitro*-Synthesen von Ligninen, sollte versucht werden, die Reaktionsbedingungen bei der Synthese von Streß-Ligninen zu simulieren.

Lignine als Senke für Chloraniline—Untersuchungen zum Bindungstyp

Frühere Arbeiten von Sandermann et al. (1992) hatten gezeigt, daß die Bioverfügbarkeit nicht-extrahierbarer Rückstände von 3,4-Dichloranilin (DCA) in Weizen, wenn diese an Ratten und Schafe verfüttert wurden, ca. 10-20 % betrug, während die Freisetzung von DCA aus einem Dehydrierungspolymerisat (DHP; synthetisches Copolymer aus Coniferylalkohol und DCA) bei ca. 65 % lag (Sandermann et al. 1990). Die unterschiedliche Bioverfügbarkeit beider Proben im Tierversuch wurde auch mit einer milden Säurehydrolyse (0.1 M HCl bei 37°C; Simulation der Bedingungen im Säugermagen) reproduziert. Diese Ergebnisse wurden mit der Existenz zweier verschiedener Bindungstypen von DCA im Lignin erklärt: Die von v.d.Trenck et al. (1981) für ein DHP postulierte Anheftung von DCA an C- α der aliphatischen Seitenkette von Lignin-Phenylpropan-Einheiten sollte nach Sandermann et al. (1992) für die Säure-Labilität der Bindung von DCA verantwortlich sein. Die Autoren vermuteten, daß, in Analogie zu Arbeiten von Simmons et al. (1989) über Copolymerisate von Guajacol und 4-Chloranilin, zusätzlich ein zweiter Bindungstyp existiert, nämlich die Bindung von DCA an C-6 des Guajacylringes, der die Säure-Stabilität der Bindung von DCA in nicht-extrahierbaren Rückständen von Weizenpflanzen ausmacht. Da in keiner der bisherigen Arbeiten die Vorschläge zum Bindungstyp von DCA in ligninartigen Polymeren durch vergleichende Untersuchungen mit geeigneten Modellsubstanzen untermauert wurden, sollte diese experimentelle Lücke in der vorliegenden Arbeit geschlossen werden. Zunächst sollten Modellsubstanzen für potentiell labile Bindungen von DCA in Ligninen synthetisiert und mittels verschiedener spektroskopischer Methoden charakterisiert werden. Die eindeutige Zuordnung der Bindungstypen von DCA im Polymer sollte durch Vergleich der Strukturdaten der Modellsubstanzen mit jenen des Polymers erreicht werden. Anschließend sollte mit dem *in vitro*-Polymer (Copolymer aus DCA und Coniferylalkohol) und den Modellverbindungen die Hydrolyse-

stabilität der verschiedenen Bindungstypen überprüft werden, um die Ergebnisse der früheren Tierversuche (s.o.) erklären zu können.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Geräte

Gerät	Hersteller / Vertrieb
Autoklav VST 40/60	Zirbus, Osterode, Deutschland
Densitometer CD 60	Desaga, Heidelberg, Deutschland
Gefriertrockner LYCOVAC GT 2	Leybold-Heraeus, Köln, Deutschland
Geltrockner	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Heizblock für Eppendorf-Reaktionsgefäße	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Homogenisator	Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland
Homogenisator Ultra-Turrax T 25	Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland
Ionenaustauscheranlage	Millipore, Eschborn, Deutschland
Kleingewächshäuser	Voss, Mainz, Deutschland
Konduktometer E 518	Metrohm, Herisau, Schweiz
Laborwaagen Sartorius LC2200S und A21UP-001	Wägetechnik München, München, Deutschland
Massenflußregler DO-2	GSF, Oberschleißheim, Deutschland
Membranpumpe MD 4-C	Vakuubrand, Wertheim, Deutschland
Mikroliterzentrifuge	Hettich, Tuttingen, Deutschland
Mikro-Dismembrator II	Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland
Mikroskop Orthophan mit Fotoaufsatz Orthomat	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom HM 350	Mikrom, Heidelberg, Deutschland
Ozon-Analysator CSI 3500	Messer-Griesheim, Duisburg, Deutschland
Ozon-Generator 500 M und Modell 500	Fischer, Meckenheim, Deutschland
PHAST-System	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
pH-Elektrode 523	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer UV-160 A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Phytokammer HPZ 90/50	Heracus-Vötsch, Balingen, Deutschland
Plexiglasbad 4P und Thermostat MT/2	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111	Büchi, Flawil, Schweiz
Schlauchpumpe MC-MS/CA 4	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Schwefeldioxid-Analysator SA 285	Messer-Griesheim, Duisburg, Deutschland
Schüttelgerät IKA-VIBRO-FIX VF 2	Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland
Schüttelgerät IKA-VIBRAX-VXR	Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland
Schüttler HT für Zellkulturen	Infors, Bottmingen, Deutschland
Speedvac-Zentrifuge UNIVAPO 100 H	Uni-Equip, München, Deutschland
Spektralphotometer UV-160A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Sterilbank HP 6.15	BDK Reinfuftechnik, Sonnenbühl, Deutschland
Stickstoffdioxid-Analysator CSI 1600 Mark III	Messer-Griesheim, Duisburg, Deutschland
Swing Out-Tischzentrifuge	Hettich Universal, Tuttingen, Deutschland
Szintillationszähler Minibeta 1221	LKB, Bromma, Schweden
Thermoschrank UM-SM-BM 100-800	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Tischzentrifuge	Hettich-Universal, Tuttingen, Deutschland
Ultraschallstab Branson B-12	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge 3K 12	Sigma, Osterode, Deutschland
Zentrifuge J2-21	Beckman, München, Deutschland

Anmerkung: Die Gerätespezifikationen aufwendiger Analyse-Geräte (GC, GC-MS, HPLC, NMR u.ä.) sind in jenen Kapiteln aufgelistet, in denen die dabei verwendeten Methoden beschrieben werden.

2. Chemikalien und Enzyme

2.1 Lösungsmittel

Lösungsmittel	Bezugsquelle	Bestellnummer	Qualität
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland	14	p.a.
Acetonitril	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland	34851	für HPLC
tert.-Butylmethylether	Merck, Darmstadt, Deutschland	1849	p.A.
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland	2445	p.A.
Dichlormethan	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland	34488	"pestanal"
Deuteriertes Wasser	Fluka, Neu Ulm, Deutschland	31239	für NMR
Deuteriertes Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	52415	für NMR
Diethylether	Merck, Darmstadt, Deutschland	929	p.A.
Dimethylsulfoxid	Aldrich, Steinheim, Deutschland	D-5879	p.A.
Dimethylformamid	Aldrich, Steinheim, Deutschland	27,054-7	für HPLC
Dioxan	Fluka, Neu Ulm, Deutschland	42510	p.A.
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland	63	p.A.
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	983	p.A.
Ethylacetat	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland	34490	"pestanal"
Methanol (LiChrosolv)	Merck, Darmstadt, Deutschland	6018	für HPLC
Pyridin	Fluka, Neu Ulm, Deutschland	82704	p.A.
Tetrahydrofuran	Aldrich, Steinheim, Deutschland	18,656-2	p.A.
Toluol	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland	34494	"pestanal"
Wasser (Ionenaustauscher)	Millipore, Eschborn, Deutschland	Selbsterstellung	bidest.

2.2 Referenzsubstanzen

Substanz	Bezugsquelle	Bestellnummer
Astringin	Geschenk von Dr. R. Pearce, Oxford, Großbritannien	Laborsammlung
Catechin	Roth, Karlsruhe, Deutschland	6200.1
Coniferin	isoliert von Dr. W. Heller und C. Elbert aus Kambialsaft von Kiefer	Laborsammlung
Coniferylaldehyd	Aldrich, Steinheim, Deutschland	38,205-1
Coniferylalkohol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	27740
p-Cumarsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	C-9028
p-Cumarylalkohol	Synthese von K. Pflanz	Laborsammlung
3,4-Dichloranilin ("pestanal")	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland	35827
Docosan (C ₂₂ H ₄₆)	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	43940
Ferulasäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland	9936
D-(+)-Galacturonsäure	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	48200
Gemahlenes Holz (<i>Picea sitchensis</i>), im Text als SWL bezeichnet	Geschenk von Prof. C. Lapiere, Grignon, Frankreich	Laborsammlung
D-(+)-Glucose	Baker, Deventer, Niederlande	0115
Guajacylglycerol-8-guajacylether	Synthese von W. Schäfer	Laborsammlung
p-Hydroxybenzaldehyd	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	H-5630
p-Hydroxybenzoesäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	H-5376

Fortsetzung Referenzsubstanzen

Substanz	Bezugsquelle	Bestellnummer
Isorhapontin	Geschenk von Dr. R. Pearce, Oxford, Großbritannien	Laborsammlung
Kämpferol-3-O-glucosid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	9321.1
Matairesinol	Herkunft unbekannt	Laborsammlung
Milled Wood Lignin (<i>Picea abies</i>), im Text als MWL bezeichnet	Geschenk von Dr. O. Faix, Hamburg, Deutschland	Laborsammlung
Picein	Roth, Karlsruhe, Deutschland	9893.1
Pinoresinol	Herkunft unbekannt	Laborsammlung
[U- ¹⁴ C] Toluol	Amersham, Braunschweig, Deutschland	C012
Tyramin	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	93810
Vanillin	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	94750

2.3 Sonstige Chemikalien und Materialien

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Acrylamid / Bisacrylamid 30 : 0.8	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3029
β -Alanin	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	05159
Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck, Darmstadt, Deutschland	12018
Ammoniakwasser	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	09860
Ammoniumnitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1188
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	A-6761
[¹⁵ N] Anilin	Chemotrade, Leipzig, Deutschland	keine Angabe
Anthron	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	10740
Bariumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland	1737
Benzidin	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	12115
N ⁶ -Benzyladenin	Merck, Darmstadt, Deutschland	1701
Bio-Rad Protein-Nachweisreagens	Bio-Rad, München, Deutschland	500-0006
Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	15244
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	165
Bortrifluorid-Etherat	Aldrich, Steinheim, Deutschland	21,660-7
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland	11746
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	2382
Cellulose (mikrokristallin) MN 301	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	816250.1
Cobaltchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	2539
Deuterierte Salzsäure	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	31231
[U-Ring ¹⁴ C] 3,4-Dichloranilin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	31,265-7
Diethyldithiocarbaminsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	D 3506
2,5-Diphenyloxazol	Zinsser, Frankfurt, Deutschland	1233500
Dithioerythritol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	D-8255
Eisensulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland	3965
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	63
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt, Deutschland	42
Ethanthiol	Aldrich, Steinheim, Deutschland	E 370-8
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland	4003
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland	4091
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland	4169

Fortsetzung Sonstige Chemikalien und Materialien

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Guajacol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	50880
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	H-3375
Historesin	LKB, Bromma, Schweden	2218-500
Hydroluma	Baker, Deventer, Niederlande	8584
3-Hydroxybiphenyl	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	54895
myo-Inositol	Merck, Darmstadt, Deutschland	4507
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	4933
Kaliumdihydrogenphosphat	Baker, Deventer, Niederlande	0240
Kaliumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	60370
Kaliumjodid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	60400
Kaliummonohydrogenphosphat	Baker, Deventer, Niederlande	0241
Kaliumnitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	5063
Kieselgel-Trockenperlen (Blaugel)	Serva, Heidelberg, Deutschland	27188
Kupferchlorid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	C-3801
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland	2790
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	5675
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland	5886
Malzextrakt-Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland	5398.0500
Mangansulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland	5963
Methylgrün/Zinkchlorid-Doppelsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland	29295
Molekularsieb 3A	Aldrich, Steinheim, Deutschland	14278
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	M-0895
1-Naphthyllessigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	6220
Natriumacetat	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	71190
Natriumborhydrid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	71320
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland	6392
Natriumchlorid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	71380
Natriumdihydrogenphosphat	Baker, Deventer, Niederlande	0303
Natrium-EDTA (Titriplex III)	Merck, Darmstadt, Deutschland	8418
Natriumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	71692
Natriumlaurylsulfat	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	717692
Natriummolybdat	Merck, Darmstadt, Deutschland	6521
Natriummonohydrogenphosphat	Baker, Deventer, Niederlande	0326
Natriumpolystyrolsulfonat (Polymerstandards)	Polymer Laboratories, Shropshire, Großbritannien	keine Angabe
Natriumsulfat	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	71960
Natriumtetraborat	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	1737
Natriumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	S-8503
Nicotinamadenindinucleotidphosphat, Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim, Deutschland	127353
Nicotinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	6817
Nylongewebe 50 µm Maschenöffnung	Seidengazefabrik, Thal, Schweiz	keine Angabe
PD-10-Säulchen	Pharmacia, Freiburg, Deutschland	17-0851-01

Fortsetzung Sonstige Chemikalien und Materialien

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Perchlorsäure (70%)	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	77230
Perlit	Dämmstoff GmbH, Dortmund, Deutschland	keine Angabe
Phloroglucinol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	7662
Phosphorsäure	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	79620
Poly-L-lysin (MW 20000-30000)	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	81333
Pufferlösung pH 4 (für pH-Elektrode)	Merck, Darmstadt, Deutschland	9435
Pufferlösung pH 7 (für pH-Elektrode)	Merck, Darmstadt, Deutschland	9439
Pufferlösung pH 10 (für pH-Elektrode)	Merck, Darmstadt, Deutschland	9438
Polystyrol (Polymerstandards)	Aldrich, Steinheim, Deutschland	keine Angabe
Polyvinylpyrrolidon (PVP-10)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	PVP-10
Pyridoxalhydrochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	7526
n-Propylgallat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	P 3130
Raney-Nickel	Aldrich, Steinheim, Deutschland	22,167-8
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland	7687
Salzsäure (37 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland	319
Schwefelsäure (95-97%)	Merck, Darmstadt, Deutschland	732
Silbernitrat	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	85228
Sudan IV	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	S-4261
NNN'-N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	LKB, Bromma, Schweden	1820-104
Thiaminchloridhydrochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	8181
Thioharnstoff	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	88810
Trichloressigsäure	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	91230
Trifluoessigsäure (Uvasolv)	Merck, Darmstadt, Deutschland	8262
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	T-1503
Wasserstoffperoxid (ca. 30 %)	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	95300
Zinksulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland	8883

2.4 Enzyme

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
Cellulase aus <i>Trichoderma viride</i>	Boehringer, Mannheim, Deutschland	238104
Chymotrypsin aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim, Deutschland	103306
Glucose-Oxidase aus <i>Aspergillus niger</i>	Boehringer, Mannheim, Deutschland	105139
β -Glucosidase aus <i>Prunus dulcis</i>	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	G 4511
Pektinase aus <i>Aspergillus niger</i>	Serva, Heidelberg, Deutschland	31662
Pronase E aus <i>Streptomyces griseus</i>	Boehringer, Mannheim, Deutschland	165921
Peroxidase aus <i>Armoracia rusticana</i>	Boehringer, Mannheim, Deutschland	413470
Trypsin aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim, Deutschland	109819

3. Nährmedien

3.1 Kulturmedium für Fichten-Suspensionskulturen

Die Bestandteile des Mediums wurden als Stammlösungen bei 4°C für maximal 4-6 Wochen gelagert. Bei Bedarf wurden die verschiedenen Stammlösungen und Saccharose zusammengegeben, auf 1 Liter mit bidest. Wasser aufgefüllt und mit 1 M KOH-Lösung auf einen pH-Wert von 5.7 eingestellt. Das Medium wurde in 200 ml Erlenmeyerkolben (35 ml Medium) bzw. 2 Liter Fernbachkolben (350 ml Medium) umgefüllt und bei 120°C für 20 min im Autoklav sterilisiert. Die sterilen Kulturgefäße wurden bei 4°C unter Lichtausschluß maximal vier Wochen gelagert.

Tab. 3. Zusammensetzung des Suspensionskultur-Mediums (nach Murashige und Skoog 1962).

Bezeichnung der Stammlösung	Einzelkomponenten	Konzentration
Makroelemente	NH ₄ NO ₃	1650 mg l ⁻¹
	KNO ₃	1900 mg l ⁻¹
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440 mg l ⁻¹
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370 mg l ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	170 mg l ⁻¹
Eisen-EDTA	KJ	830 mg l ⁻¹
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27.4 mg l ⁻¹
	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	37.2 mg l ⁻¹
	MnSO ₄ x H ₂ O	16.7 mg l ⁻¹
	H ₃ BO ₃	6.2 mg l ⁻¹
Mikroelemente	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10.6 mg l ⁻¹
	NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	250 µg l ⁻¹
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	250 µg l ⁻¹
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	100 µg l ⁻¹
	myo-Inosit	100 mg l ⁻¹
Vitamine	Nicotinsäure	500 µg l ⁻¹
	Pyridoxin/HCl	500 µg l ⁻¹
	Thiamin/HCl x H ₂ O	100 µg l ⁻¹
	N ⁶ -Benzyladenin	1 mg l ⁻¹
	1-Naphthylessigsäure	3 mg l ⁻¹
Saccharose		30 g l ⁻¹

3.2 Nährmedium zur Anzucht von Fichten-Keimlingen

Die Komponenten des Nährmediums für Fichten-Keimlinge wurden als Stammlösungen bei 4°C für maximal 4-6 Wochen gelagert. Für einen Ansatz wurden die verschiedenen Lösungen zusammengegeben, das Volumen auf 1 Liter ergänzt und im Autoklav bei 120°C für 20 min sterilisiert.

Tab. 4. Zusammensetzung des Nährmediums für Fichten-Keimlinge (modifiziert von C. Langebartels nach Ingestad 1959).

Bezeichnung der Stammlösung	Einzelkomponenten	Konzentration
Makroelemente	NH_4NO_3	142.9 mg l ⁻¹
	NaCl	12.7 mg l ⁻¹
	KCl	1.3 mg l ⁻¹
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	152.1 mg l ⁻¹
	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	500 µg l ⁻¹
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	146.7 mg l ⁻¹
Mikroelemente	KH_2PO_4	43.9 mg l ⁻¹
	H_3BO_3	972 µg l ⁻¹
	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	88 µg l ⁻¹
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	80 µg l ⁻¹
	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	79 µg l ⁻¹
Eisen-EDTA	$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	2.8 mg l ⁻¹
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	3.7 mg l ⁻¹

3.3 Kulturmedium für *Rhizosphaera kalkhoffii*

Rhizosphaera kalkhoffii Bubak ist ein Schwächeparasit der Fichte, der meist auf der Unterseite der Nadeln zu finden ist (Butin und Wagner 1985). Bei dem in unserem Labor kultivierten Pilzmyzel handelt es sich um ein Geschenk von W. Oßwald (Botanisches Institut der Technischen Universität München). Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen in Petrischalen auf Malzagar (Merck, Darmstadt) in 100 ml bidest. Wasser im Halbdunkel bei 26°C. Für die Elicitorpräparation wurden größere Mengen des Pilzmyzels benötigt. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen ein bis zwei Spatelspitzen Myzel von der Petrischale abgekratzt und in einem 2 l Fernbachkolben mit 400 ml Malzmedium (s.o. ohne Zugabe von Agar) überführt und verteilt. Das Myzel wurde drei bis vier Wochen im Halbdunkel bei 26°C weiterkultiviert und alle 10-14 Tage gut durchmischt. Anschließend wurde das Medium abdekantiert, das Myzel viermal mit 1 l bidest. Wasser gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefrieretrocknet (LYCOVAC GT 2, Leybold-Heraeus, Köln). Das gereinigte Myzel wurde bei -80°C gelagert.

4. Pflanzenmaterial

4.1 Zellkulturen

4.1.1 Anlage von Fichten-Suspensionskulturen

Ausgangsmaterial für die Anlage der Suspensionskulturen waren Kalluskulturen von *Picea abies* (L.) Karst. Diese wurden von B. Meßner (GSF, Institut für Zellchemie, Neuherberg) 1989 aus Oberflächen-sterilisierten Nadeln von etwa 60 Jahre alten Fichten angelegt und am

Institut kultiviert. Die Kalluskulturen wurden alle zwei Wochen auf frisches Agar-Nährmedium überimpft. Für die Präparation von mixotrophen Suspensionskulturen wurden 500 mg Kallus in 300 ml Flüssigmedium überführt. Die Kulturen wurden bei 27°C unter definierten Dauerlicht-Bedingungen (Osram L 40 W/77, 1000 Lux) mit 50 rpm geschüttelt. Alle drei bis vier Tage wurden 35-45 g Zellen (Naßgewicht) in 350 ml frisches Nährmedium überimpft (Abb. 7).



Abb. 7. Mixotrophe Fichten-Suspensionskulturen.

4.1.2 Charakterisierung der Fichten-Suspensionskulturen

Zur Charakterisierung der mixotrophen Zellkultur wurde eine Wachstumskurve über 25 Tage aufgenommen (Abb. 8). Genau 3.5 mg Naßgewicht einer drei Tage alten Suspensionskultur wurden in 20 ml Kolben mit 35 ml Medium angeimpft.

Frischgewicht der Suspensionszellen

Die Zellen eines Kolbens wurden jeweils auf ein Filterpapier (Ø 90 mm, Schleicher und Schüll, Dassel) abgesaugt und deren Frischgewicht gravimetrisch bestimmt. Das Frisch-

gewicht ergab sich aus der Differenz von Gesamtgewicht (Zellen plus Filter) und Gewicht des Filters.

Leitfähigkeit des Mediums

Die Leitfähigkeit des von den Zellen abgetrennten Mediums wurde mit einem Konduktometer (E 518; Metrohm, Herisau, Schweiz) ermittelt.

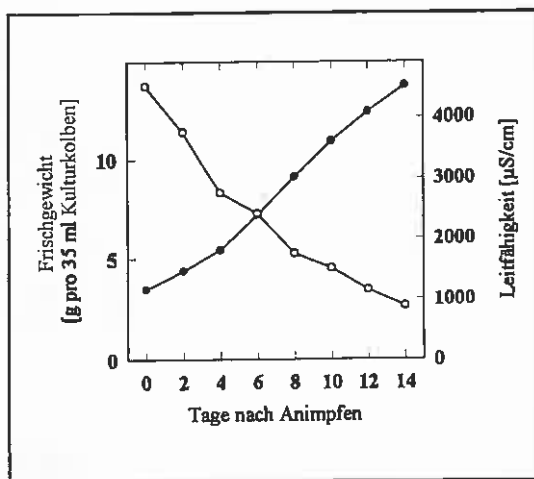


Abb. 8. Verlauf von Frischgewicht und Leitfähigkeit bei Fichten-Suspensionskulturen. Symbole: $\circ$ Frischgewicht; $\bullet$ Leitfähigkeit.

4.2 Fichten-Keimlinge

4.2.1 Aseptische Anzucht der Keimlinge in Hydrokultur

Die Samen von Fichte (*Picea abies*) wurden von der staatlichen Samenklengung und Pflanzgarten in Laufen (Bayerische Landesanstalt für forstliche Saat- und Pflanzenanzucht) bezogen. Sie trugen die interne Bezeichnung Nr. 84019 des Pflanzgartens Laufen und stammten aus dem Reifejahr 1985. Die Fichtensamen wurden über Nacht in Leitungswasser gequollen. Zur Oberflächen-Sterilisation wurden sie 30 min in 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid gerührt und mit sterilem bidest. Wasser gewaschen, bis keine Gas-Entwicklung mehr zu beobachten war. Kunststoffgefäße (23 x 7.5 x 5 cm, Schubladenteiler, Curver) wurden mit in Wasser gewaschenem Perlit (Dämmstoff GmbH, Dortmund) ca. 4 cm hoch befüllt. Die mit einem sauberen Tuch getrockneten Samen wurden gleichmäßig auf das Perlit ausgesät (ca. 100 Stück pro Gefäß). Je 7 Gefäße wurden in die Schalen von Kleingewächshäusern (69 x 33 x 24 cm, Voss, Mainz) gestellt. Diese wurden ca. 2 cm hoch mit bidest. Wasser gefüllt und mit Plexiglashauben abgedeckt. Die Kleingewächshäuser standen in einer begehbaren Phytokam-

mer (HPZ 90/50, Heraeus-Vötsch, Balingen). Die Anzucht erfolgte mit einem diurnalen Rhythmus (14 h Licht, 10 h Dunkel). Die Temperatur betrug 22/18°C (Tag/Nacht), die relative Luftfeuchte 75 %, die Beleuchtungsstärke $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sylvania Cool White, FR 95 T1/215 W) und der Luftdurchsatz $60 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Die Zuluft wurde über verschiedene Filtereinheiten (Partikel-, Aktivkohle- und Permanganatfilter) gereinigt und somit die Konzentration von Luftschadstoffen in der Kammer unter 15 nl l^{-1} gesenkt (Payer und Seckmeyer 1988). Nach 7 Tagen wurden die verstellbaren Lüftungsschlitze an den Plexiglashauben der Kleingewächshäuser im Abstand von zwei Tagen stufenweise geöffnet. Nach insgesamt 14 Tagen wurde die Haube ganz abgenommen und die Keimlinge mit Nährmedium gedüngt. Nach vollständiger Aufnahme der Lösung erfolgte alle 2-3 Tage die Zugabe von bidest. Wasser. Um ein Pilzwachstum zu vermeiden, wurden die Samenschalen direkt nach ihrem Abwurf entfernt. Für die Ozon-Exposition wurden Keimlinge im Alter von sechs Wochen verwendet (Abb. 9).

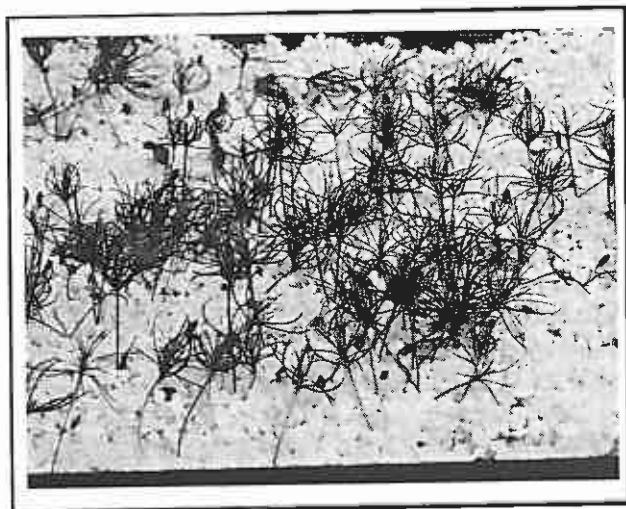


Abb. 9. Fichten-Keimlinge im Alter von 14 Tagen.

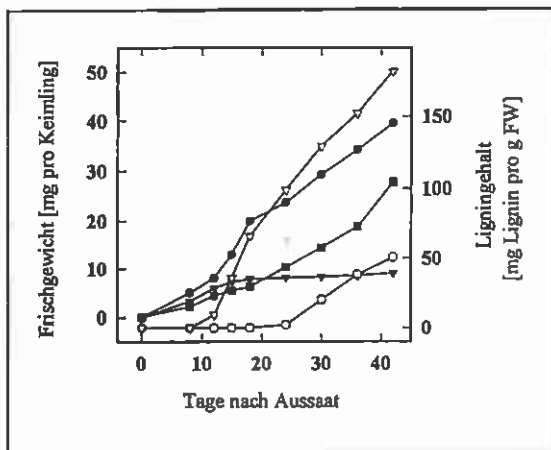
4.2.2 Charakterisierung des Wachstumsverlaufs der Fichten-Keimlinge

Zur Charakterisierung des Wachstums wurden während 6 Wochen in Abständen von einigen Tagen das Frischgewicht von Nadelkranz, Hypokotyl und Wurzel, sowie der Ligningehalt (Ligninbestimmung s. II 9.) bestimmt (Abb. 10). Die Keimung der Samen begann zwischen dem dritten und fünften Tag nach Aussaat mit dem Wachstum von Keimwurzel und Hypokotyl. Nach 6-8 Tagen erschienen die Kotyledonen unter der noch aufsitzenenden Samenschale. Etwa 11-14 Tage nach Aussaat wurden die Spitzen der ersten Primärnadeln sichtbar. Das Gewicht der Nadelkränze stieg bis zur 6. Woche annähernd linear

an. Lignin akkumulierte linear in Nadeln ab der vierten Woche nach Aussaat. Die Frischgewichtszunahme der Hypokotyle verlief während der ersten 2.5 Wochen annähernd linear und stagnierte dann. Der Ligningehalt der Hypokotyle stieg im gesamten Versuchszeitraum deutlich an. Der Wachstumsverlauf bei den Wurzeln war vergleichbar den Nadeln. Das absolute Gewicht der Wurzeln lag 40-75 % niedriger als jenes der Nadeln.

Abb. 10. Wachstumscharakteristik der Fichtenkeimlinge.
Symbole:

- Gewicht Nadelkränze
- Ligningehalt Nadelkränze
- ▼— Gewicht Hypokotyle
- ▽— Ligningehalt Hypokotyle
- Gewicht Wurzeln



5. Präparation eines *Rhizosphaera kalkhoffii*-Elicitors

(modifiziert von B. Meßner nach Ayers et al. 1976)

Das aus der Flüssigkultur des Pilzes (siehe 3.3) gewonnene Myzel wurde ausgiebig mit Wasser gewaschen, bis das nach Filtration durch Nylogewebe (50 µm Maschenöffnung, Seidengazefabrik, Thal, Schweiz) erhaltene Filtrat klar erschien. Nach Lyophilisierung wurden 200 mg gefriergetrocknetes Myzel mit 20 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) im Ultra-Turrax zerkleinert, mit einem Homogenisator (Braun, Melsungen) weiter homogenisiert und eine Minute im Ultraschallbad gehalten. Nach Zentrifugation wurden die Myzelreste dreimal mit Wasser gewaschen und jeweils im Ultra-Turrax resuspendiert. Es wurde zentrifugiert, mit 20 ml Aceton resuspendiert, homogenisiert (Ultra-Turrax) und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde 24 h an der Luft getrocknet, in bidest. Wasser (5 mg·ml⁻¹) aufgenommen und bei 120°C für 20 min im Autoklav sterilisiert. Die unlöslichen Bestandteile der Elicitorpräparation setzten sich nach wenigen Stunden am Boden des Aufbewahrungsgefäßes ab und der als Elicitor verwendete lösliche Überstand konnte mit einer Pipette bei Bedarf abgenommen werden. Der Kohlenhydratgehalt des Elicitors wurde mit Hilfe der Anthron-Methode bestimmt (s. II 10.4.1).

6. Elicitor-Behandlung der Fichten-Suspensionskulturen

Induktion der Zellkulturen

Für die Induktion der Ligninbildung wurden zwei verschiedene Versuchsansätze gewählt:

- 1.) Zur Gewinnung von größeren Mengen extrazellulärem ligninartigen Materials (Strukturaufklärung) wurden in einem 2 l Fernbachkolben 35 g Zellen (Naßgewicht) mit 350 ml Medium angeimpft. Nach drei Tagen erfolgte die Zugabe von 10 ml einer Elicitorlösung von *Rhizosphaera kalkhoffii* (entsprechend 1.0 mg Glucoseäquivalenten pro ml Medium; bestimmt nach der Anthron-Methode (s. II 10.4.1)).
- 2.) In sämtlichen anderen Experimenten wurden 200 ml Erlenmeyerkolben verwendet, die mit 3.5 g Zellen in 35 ml Medium beschickt waren. Zur Induktion der Ligninbiosynthese wurde dann 1 ml der obigen Elicitorpräparation zugegeben.

Aufarbeitung von Zellen und Medium

- 1.) Präparative Isolierung von extrazellulärem ligninartigem Material: Das Kulturmedium (350 ml pro Fernbachkolben) wurde mittels Filtration durch Nylon-Gewebe (50 µm Maschenöffnung, Seidengazefabrik, Thal, Schweiz) von den Zellen getrennt und 30 min bei 25900 x g zentrifugiert (verteilt auf zwei 250 ml Zentrifugenbecher aus Polypropylen; Rotor JA 14, Beckman, München). Das in das Medium sekretierte Polymer bildete einen Niederschlag, von dem der Überstand abdekantiert wurde. Das Pellet wurde mit je 150 ml 1% SDS (w/v), 1 M NaCl, und dreimal mit bidest. Wasser gewaschen. Nach Gefriertrocknung wurde das Polymer bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert (Ausbeute 10-20 mg pro Kulturkolben). Die Zellen (50-70 mg) wurden mit 300 ml bidest. Wasser gewaschen und nach Gefriertrocknung bei -80°C aufbewahrt.
- 2.) Sonstige Experimente: Das von den Zellen mittels Filtration (s.o.) getrennte Kulturmedium (35 ml pro Erlenmeyerkolben) wurde wie oben zentrifugiert (verteilt in zwei 25 ml Zentrifugenbecher aus Polypropylen; Rotor JA 20, Beckman, München). Der Überstand wurde direkt weiterverarbeitet (s. II 11.1). Das Pellet wurde wie oben mit je 15 ml der jeweiligen Waschlösung von Verunreinigungen befreit und auf die gleiche Weise weiterverarbeitet. Die Zellen wurden mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Ausbeute an gereinigtem extrazellulärem Polymer betrug 1.8-2.5 mg pro Kulturkolben (35 ml Medium).

7. Ozon-Behandlung von Fichten-Keimlingen

Ozonerzeugung und -analyse in klimatisierten Küvetten

Ozon wurde mit einem Ozongenerator (500 M, Fischer) aus reinem Sauerstoff erzeugt und

mit Hilfe eines Massenflußreglers (Typ Do-2, GSF) in die gereinigte Zuluft (s. II 4.2.1) der Expositionsküvette aus Plexiglas zudosiert. Die Ozonanalyse erfolgte mit einem Ozonanalysator (CSI 3100) UV-photometrisch bei 250 nm. Simultan wurden Stickoxide (NO , NO_2) luminometrisch (CSI 1600 Mark 3) und Schwefeldioxid fluoreszenzanalytisch (SA 285) erfaßt. Die für die Ozon-Exposition von Keimlingen verwendete Plexiglas-Küvette (70 x 110 x 110 cm) befand sich in einer klimatisierten Kammer (Volumen 10 m^3). Unter Standardbedingungen lag eine Temperatur von $25 \pm 2^\circ\text{C}$ und eine relative Feuchte von 70-75 % vor. Das Küvettenvolumen betrug 0.85 m^3 , der Luftdurchsatz $60 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, bei einer Windgeschwindigkeit von $0.05 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ am Auslaßrohr. Durch Leuchtstoffröhren (Philips Warmton TLD 58 W/29, Duro Lite true light 50/3; Lichtintensität $94 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), die an der Decke der Kammer angebracht waren, wurde eine gleichmäßige Ausleuchtung erzielt (Langebartels et al. 1991).

Ozonbehandlung von Fichten-Keimlingen

Die Ozonbehandlung der Keimlinge erfolgte in Plexiglas-Küvetten (70 x 110 x 110 cm) innerhalb einer Phytokammer, deren Klimabedingungen (Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Tag/Nacht-Rhythmus, Licht, Luftdurchsatz, Reinigung der Zuluft) jenen der Anzuchtkammer entsprachen (s. II 4.2.1). Vor den Versuchen wurden die Keimlinge jeweils zwei Tage in den Behandlungsküvetten akklimatisiert. Mit Hilfe von Ventilatoren wurde eine ausreichende Durchmischung der Küvettenluft erreicht (Abb. 11).



Abb. 11. Fichten-Keimlinge während der Ozonbehandlung in einer Plexiglas-Küvette

Eine Ozonexposition der Keimlinge wurde über 25 Tage durchgeführt. Dabei wurde täglich für 8 h zwischen 12 und 20 Uhr Ozon in Konzentrationen von 300 nl l^{-1} oder 600 nl l^{-1} zudosiert. Die Kontrollkeimlinge wurden ständig in Reinfluft kultiviert. Die Probenahmen fanden jeweils nach Beendigung der Ozonbehandlung statt. Während der Ernten wurden jeweils 50 Keimlinge aus den Anzuchtschalen entnommen und in Nadelkranz, Hypokotyl und Wurzel aufgeteilt. Alle Pflanzenteile einer Ernte und Behandlungsvariante wurden gesammelt, gewogen und anschließend bei -80°C eingefroren.

8. Analyse von phenolischen Inhaltsstoffen

8.1 Extraktion der Methanol-löslichen Inhaltsstoffe aus Suspensionszellen

Etwa 200 mg der tiefgefrorenen Suspensionszellen wurden in einem Mörser mit 2 ml Methanol verrieben, in ein 10 ml Reagenzglas überführt und der Mörser zweimal mit je 1 ml Methanol nachgewaschen. Es wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert (Swing Out-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen). Vom Überstand wurden 1.8 ml in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und zur Trockene eingengt (Speedvac-Zentrifuge, Uni Equip, München). Der Rückstand wurde in 200 μl 75 % (v/v) wäßrigem Methanol aufgenommen, unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (2 min Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen) und der klare Überstand wurde mittels HPLC analysiert.

8.2 Analyse Zellwand-gebundener Inhaltsstoffe

8.2.1 Zellwandpräparation

Suspensionszellen

Etwa 400 mg der tiefgefrorenen Zellen wurden mit 1.5 ml Methanol im Mörser verrieben und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Mischung wurde 30 min kräftig durchmischt (IKA-VIBRAX-VXR, Janke und Kunkel, Staufen) und zentrifugiert (5 min Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen). Das Pellet wurde mit jeweils 1.5 ml der folgenden Solventien und Lösungen gewaschen (15 min Schüttler, 5 min Tischzentrifuge): i) Methanol (dreimal), ii) 1 M NaCl, iii) 1% (w/v) Natriumlaurylsulfat, iv) bidest. Wasser (zweimal), v) Ethanol, vi) Chloroform/ Methanol (1:1; v/v), vii) tert-Butylmethylether. Das zuletzt erhaltene Pellet wurde über Nacht gefriergetrocknet (LYCOVAC GT 2, Leybold-Heraeus, Köln). Aus 400 mg Zellen (Frischgewicht) wurden auf diese Weise 15-25 mg Zellwandmaterial gewonnen.

Keimlinge

Etwa 200 mg der bei -80°C gelagerten Nadeln oder Hypokotyle wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einem mit einer Achatkugel versehenen Teflonbehälter für eine Minute homogenisiert (Mikro-Dismembrator II, Braun, Melsungen). Das pulvrige Homogenat wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und wie oben beschrieben weiter aufgearbeitet. Die Ausbeute an Zellwandmaterial betrug bei einer Einwaage von 200 mg Keimlingsmaterial 30-35 mg (Nadeln) bzw. 40-50 mg (Hypokotyle).

8.2.2 Alkalische Hydrolyse der Zellwände bei 80°C

Etwa 20 mg der trockenen Zellwandpräparationen wurden in ein mit Argon befülltes 1.5 ml Schraubdeckel-Eppendorfgefäß eingewogen und unter Sauerstoffausschluß mit 400 μl 1 M Natronlauge versetzt. Die Mischung wurde für vier Stunden in einem Metall-Heizblock (Liebisch, Bielefeld) auf 80°C erhitzt. Anschließend wurden zur Neutralisation 400 μl 1.5 M Ameisensäure zugegeben, die Mischung zentrifugiert (5 min Tischzentrifuge; Hettich, Tuttlingen) und der Überstand wurde in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dieser Überstand wurde direkt der HPLC-Analyse zugeführt.

8.2.3 Saure Hydrolyse der vorbehandelten Zellwände bei 100°C

Zur vollständigen Entfernung restlicher Hydrolysekomponenten wurde das Pellet nach alkalischer Hydrolyse mit 1 ml bidest. Wasser gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Rückstand wurden 200 μl 6 M HCl gegeben, es wurde gut durchmischt und für 4 h auf 100°C erhitzt. Nach Neutralisation mit 200 μl 6 M NaOH wurde zentrifugiert (2 min Tischzentrifuge wie oben) und der wäßrige Überstand für die HPLC-Analyse entnommen.

8.3 Extraktion phenolischer Inhaltsstoffe aus dem Medium

Das Medium der Suspensionskulturen (35 ml) wurde direkt nach der Ernte von den Zellen mittels Filtration über Nylon-Gewebe (50 μm Maschenöffnung, Seidengazefabrik, Thal, Schweiz) getrennt. Das komplette Medium eines Kulturkolbens wurde zweimal gegen jeweils 20 ml Ethylacetat extrahiert, die gesammelten organischen Phasen wurden im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand in 200 μl Methanol/Wasser (4:1; v/v) aufgenommen. Vor der HPLC-Analyse wurde für 5 min zentrifugiert (15000 rpm, Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen).

8.4 Analytik phenolischer Inhaltsstoffe mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

HPLC-Anlage

Die phenolischen Inhaltsstoffe wurden mit der folgenden HPLC-Anlage (System Gold; Beckman, München) analysiert:

Bauteil/Software	Hersteller
Analog Interface 406	Beckman, München, Deutschland
Dioden-Array-Detektor 168	Beckman, München, Deutschland
Fluoreszenz-Monitor RF-535	Shimadzu, Kyoto, Japan
HPLC Sample-Injector 231	Gilson, Villiers, Frankreich
HPLC Dilutor	Gilson, Villiers, Frankreich
Programmable Detector Module 166	Beckman, München, Deutschland
Programmable Solvent Module 126	Beckman, München, Deutschland
Software System Gold	Beckman, München, Deutschland

HPLC-Säule

Säule	Hersteller
ODS Hypersil (5 µm), 4.6 mm x 250 mm	Bischoff, Leonberg, Deutschland

HPLC-Laufmittel

- | | |
|--------------------------------------|---|
| A. | Wasser/Ammoniumformat* (98 : 2)
filtriert über Membranfilter HVLP 04700 Millipore, Eschborn, Deutschland |
| B | Methanol/Wasser/Ammoniumformatlösung* (88 : 7 : 5; v/v/v)
filtriert über Membranfilter HVHP 04700 Millipore, Eschborn, Deutschland |
| * 5 % Ammoniumformat in Ameisensäure | |

Laufmittelgradient

Zur Auftrennung phenolischer Inhaltsstoffe wurden die Laufmittel A und B in einem linearen Gradientenprogramm (Flußrate 1 ml·min⁻¹) verwendet:

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	Dauer [min]
0	100	0	5
5	0	100	40
45	100	0	5
60			Beginn nächster Lauf

Detektionsmethoden

UV-Absorption bei 280 nm

Fluoreszenzdetektion (Anregung bei 300 nm, Emission bei 400 nm)

Dioden-Array-Detektion zwischen 250 und 450 nm

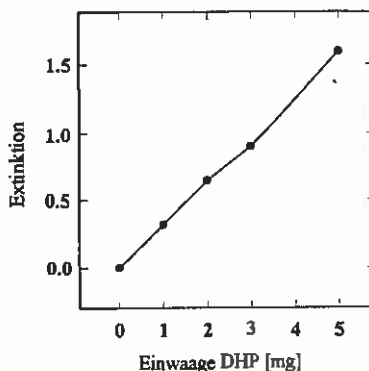
9. Ligninnachweis und -Quantifizierung in Fichten-Suspensionskulturen und Keimlingen

9.1 Nachweis als Lignin-Thioglycolsäure-Derivate

Etwa 5 mg gewaschenes extrazelluläres Polymer aus dem Medium der Suspensionskulturen (s. II 6.) bzw. 10-15 mg Zellwandmaterial (s. II 8.2.1) wurden in 1.5 ml Eppendorfgefäße mit Schraubdeckel eingewogen. Es wurden 1 ml 2 M HCl und 0.2 ml Thioglycolsäure zugegeben und das gut verschlossene Gefäß wurde für vier Stunden bei 95°C im Metallheizblock (Liebisch, Bielefeld) inkubiert und währenddessen gelegentlich mit der spitzen Seite über ein Drahtgitter gezogen, um die Reaktionsmischung zu suspendieren. Nach dem Abkühlen wurde 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und das Pellet dreimal mit je 1 ml bidest. Wasser gewaschen. Das nach Zentrifugation wie oben erhaltene Pellet wurde in 0.5 M NaOH suspendiert und die Mischung über Nacht auf einem Schüttler gehalten (IKA-VIBRAX VXR, Janke und Kunkel, Staufen). Es wurde erneut zentrifugiert, der Überstand in ein 2 ml Eppendorfgefäß abdekantiert und mit 0.5 ml 0.5 M NaOH nachgewaschen. Die so erhaltene Lösung wurde mit 0.3 ml konz. HCl angesäuert und zum Ausfällen der Lignin-Thioglycolsäure-Derivate (LTGA) vier Stunden bei 4°C belassen. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (s.o.) und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml 0.5 M NaOH gelöst, die Lösung im Verhältnis 1 : 40 mit 0.5 M NaOH verdünnt und die Absorption bei 280 nm im Photometer (UV-160 A, Shimadzu, Kyoto, Japan) gemessen. Um eine Quantifizierung der gebildeten LTGA zu ermöglichen, wurden verschiedene Mengen eines Dehydrierungspolymerisates aus Coniferylalkohol (s. II 13., DHP 1) mit Thioglycolsäure derivatisiert (Abb. 12).

Ausgehend von der Annahme, daß ein ausschließlich aus Coniferylalkohol unter oxidativen Bedingungen gewonnenes Polymerisat ein „reines“ Lignin darstellt, wurde aus der Absorption der nach Derivatisierung gebildeten LTGA und der Einwaage an DHP eine Eichgerade erstellt (Abb. 12). Im Ergebnisteil sind demnach die Konzentrationen an Lignin-artigem Material in Fichten-Suspensionskulturen und Keimlingen in µg Lignin angegeben.

Abb. 12. Eichkurve für die Quantifizierung von ligninartigem Material. Dazu wurden verschiedene Mengen eines Dehydrierungspolymerisates (s. II. 13, Nr. 1) mit Hilfe der LTGA-Methode derivatisiert und die Absorption der Reaktionsprodukte bei 280 nm im Photometer gemessen.



9.2 Nachweis mit Phloroglucinol/HCl

Etwa 5 mg des extrazellulären Polymers bzw. 5-10 mg Zellwände (Keimlinge) wurden in 200 µl Dimethylsulfoxid so weit als möglich gelöst (1 min Ultraschallstab Branson B-12, Bachofer, Reutlingen). Nach Zentrifugation (5 min Tischzentrifuge) wurden 100 µl vom Überstand abgenommen, mit 100 µl einer ethanolischen Phloroglucinol-Lösung (4 %; w/v) und 3.5 ml rauchender HCl versetzt und vermischt. Für Vergleichsmessungen wurde möglichst bald die Extinktion im Photometer bei 555 nm gemessen.

9.3 Histochemische Nachweise

Lösliche Komponenten von Nadeln und Hypokotylen der Fichten-Keimlinge wurden durch Einlegen der Präparate für jeweils 1 h in Ethanol/Wasser-Mischungen (in der Reihenfolge 10 %, 30 %, 60 %, 80 % und 100 % Ethanol) entfernt. Anschließend wurden die Proben in Historesin (LKB, Bromma, Schweden) eingebettet. Durch Erhitzen auf 40°C (Thermoschrank, Memmert, Schwabach) wurde das Material auspolymerisiert. Nach 12 h war dieser Vorgang abgeschlossen. Nun wurden am Mikrotom (HM 350, Mikrom, Heidelberg) Querschnitte von 10 µm Dicke erhalten, die auf mit Poly-L-lysin beschichtete Objektträger aufgebracht wurden. Die Präparate wurden dann unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Orthophan, Leitz, Wetzlar) untersucht. Die UV-Autofluoreszenz phenolischer Zellwand-Polymere wurde 340-380 nm (Filterblock A, Leitz, Wetzlar) angeregt und die Emission bei 430 nm verfolgt. Eine gelbe Autofluoreszenz wurde nach Blaulicht-Anregung (Anregung bei 450-490 nm, Emission bei 515 nm) erhalten. Zum Nachweis von Lignin-artigen Polymeren wurden die Präparate in eine frisch angesetzte Lösung aus 5 ml Phloroglucinol (4 % in

Ethanol) und 5 ml 32 % HCl eingetaucht. Lignine entwickeln durch Reaktion mit diesem Farbreagens eine kirschrote Färbung, die im Durchlicht sichtbar ist. Suberin-artige Polymere wurden als orangefarbene Zonen nach Inkubation mit einer Sudan IV-Lösung (2 % in Ethanol) in der Durchlicht-Mikroskopie nachgewiesen.

10. Charakterisierung des extrazellulären Polymers

10.1 Thioacidolyse

10.1.1 Thioacidolyse (Schritt 1)

In einen mit 20 ml Dioxan befüllten 100 ml Meßkolben wurden 2.5 ml Bortrifluorid-Etherat und 10 ml Ethanthiol zugegeben und anschließend mit Dioxan auf ein Endvolumen von 100 ml eingestellt. Das farblose Thioacidolyse-Reagens ist demnach eine Lösung von 0.2 M BF_3 -Etherat in einer Mischung von Dioxan/EtSH (8.75 : 1; v/v). Es wurde direkt nach dem Zusammengeben der Einzelkomponenten verwendet. Etwa 4-8 mg extrazelluläres Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen bzw. 7-15 mg Zellwandmaterial von Fichten-Keimlingen wurden in ein 10 ml Reagenzglas mit Schraubverschluß und Deckel mit Teflonbeschichtung (Pyrex, Bender und Hobein, München) eingewogen. Nach Zugabe von 5 ml des oben beschriebenen Reagens' wurden die Pyrex-Reagenzgläser gut verschlossen und im Ölbad für vier Stunden auf 100°C erhitzt. In regelmäßigen Abständen wurden die Reaktionsgefäße aus dem Bad genommen und durchmischt. Die Reaktionsmischung wurde auf Eis abgekühlt, durch Waschen des Gefäßes mit 10-20 ml bidest. Wasser in ein 100 ml Becherglas überführt und der pH-Wert auf 3-4 durch Zugabe von 0.4 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingestellt. Nun wurde gegen 30 ml Dichlormethan, worin 0.25 mg Docosan ($\text{C}_{22}\text{H}_{46}$; interner Standard für die Gaschromatographie) gelöst waren, im Scheidetrichter extrahiert. Die Extraktion wurde dreimal mit 25 ml Dichlormethan wiederholt, die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeengt (Rotationsverdampfer, Büchi, Flawil, Schweiz; Membranpumpe MD 4-C, Vakuubrand, Wertheim). Der Rückstand wurde in 0.5-1.0 ml Dichlormethan aufgenommen. Etwa 5-10 µl dieser Lösung wurden in einem Quarzvial mit Teflonbeschichtetem Deckel (Supelco, Bad Homburg) mit 100 µl Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) und 10 µl Pyridin silyliert (30-60 min bei Raumtemperatur). Die Analyse der Thioacidolyseprodukte mittels einer Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) ist im Abschnitt II 10.1.3 beschrieben.

10.1.2 Desulfurierung der Thioacidolyseprodukte (Schritt 2)

Für die Desulfurierung wurden ca. 300-700 µl der Dichlormethanolösung nach Thioacidolyse in ein 20 ml Pyrex-Reagenzglas (Bender und Hobein, München) überführt, 1-2 ml

einer wäßrigen Suspension von Raney-Nickel (Aldrich, Steinheim) sowie 5 ml Dioxan zugegeben. Die Mischung wurde für vier Stunden bei 50°C im Ölbad inkubiert, die Reaktionslösung auf Eis abgekühlt, der Deckel des Reagenzglases sehr vorsichtig geöffnet (gebildeter Wasserstoff tritt aus!) und die Lösung mit 10-20 ml bidest. Wasser und 10 ml Dichlormethan in einen Scheidetrichter überführt. Es wurde dreimal mit je 30 ml Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen wurden gesammelt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand in 0.2 ml Dichlormethan aufgenommen. Die Silylierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

10.1.3 Analyse der Thioacidolyseprodukte mittels Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)

GC-System

Von den silylierten Thioacidolyse-Proben wurden 2-8 µl entnommen und in den GC-Injektor eingespritzt. Die Routine-Untersuchungen zur Quantifizierung der auftretenden Produkte wurden mit dem folgenden GC-System durchgeführt:

Gerät/Bauteil	Hersteller
<i>Anlage A</i> Gaschromatograph D 1200 Mooving-Needle-Injektor FID-Detektor Polysiloxan-Kapillarsäule DB1, 30m x 0.32 mm Innendurchmesser, Filmdicke 0.25µm	Delsi, Frankreich Delsi, Frankreich Delsi, Frankreich Supelco, Belafonte, USA
Bedingungen	
Temperaturprogramm: 90→260°C mit 5°·min ⁻¹ Carriergas: Helium Einlaßdruck: 0.5 bar	

GC-MS-System

Die Identität der auftretenden GC-Peaks wurde durch Analyse mittels GC-MS überprüft. Dazu wurde das folgende chromatographische System verwendet:

Gerät/Bauteil	Hersteller
<i>Anlage B</i> Gaschromatograph DI 700 Quadrupol-Massenspektrometer R 10-10 B Polysiloxan-Kapillarsäule DB1, 30m x 0.32 mm Innendurchmesser, Filmdicke 0.25 µm Software Spectral 20	Delsi, Frankreich Nermag, Frankreich Supelco, Belafonte, USA Nermag, Frankreich

Bedingungen

Temperaturprogramm: 130→260°C mit 5°·min⁻¹

Carriergas: Helium

Einlaßdruck: 0.7-1.0 bar

Ionisierung: Electron Impact bei 70 eV, Ionenquelle bei 100°C, Interface bei 260°C

Scanning Range: 60-600 a.u.

10.1.4 Zuordnung der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten

Mechanismus der Thioacidolyse

Die Thioacidolyse ist eine Solvolyse in Dioxan/Ethanthiol (schwaches Nukleophil) und Bortrifluorid-Etherat (harte Lewis-Säure), die zur Depolymerisierung von Lignin führt. Das Reagens spaltet das Lignin-Polymer selektiv an β -O-4-Bindungen, dem am häufigsten vorkommenden Strukturelement. Die monomeren und dimeren Reaktionsprodukte nach Thioacidolyse können mittels GC-MS den Bindungstypen im Polymer zugeordnet werden (Lapierre et al. 1986, Lapierre et al. 1991). Der Mechanismus, durch den die Spaltung der Arylglycerol- β -O-arylether-Bindung vom Thioacidolyse-Reagens hervorgerufen wird, wurde von Lapierre et al. (1985) vorgeschlagen, nachdem entsprechende Modellverbindungen einer Thioacidolyse unterzogen worden waren (Abb. 13).

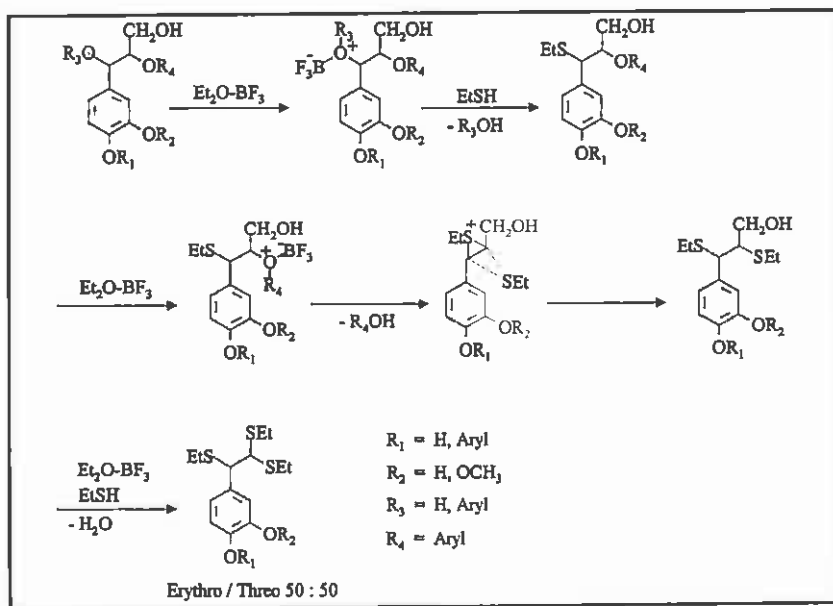


Abb. 13. Postulierter Mechanismus der Thioacidolyse (nach Lapierre et al. 1985).

Der erste Schritt der Reaktion ist demnach eine nukleophile Addition von Bortrifluorid an die Benzylalkohol oder -ether-Bindung des β -C-Atoms der aliphatischen Seitenkette eines Arylglycerol-Bausteins. Das intermediär entstehende Oxoniumion wird durch das stärkere Nukleophil Ethanthiol angegriffen, wobei sich eine Thioetherbindung am C- α ausbildet. Die Spaltung der β -O-Arylether-Bindung führt unter Einwirkung der benachbarten Thioethyl-Gruppe zu einem cyclischen Sulfonium-Intermediat, welches im folgenden durch Ethanthiol angegriffen wird und in der Ausbildung einer zweiten Thioetherbindung resultiert. Eine dritte Addition von Ethanthiol ergibt ein Paar von *Erythro/Threo*-Diastereomeren im Verhältnis 50:50, unabhängig von der Stereochemie der ursprünglichen Struktur.

Charakterisierung der monomeren Thioacidolyse-Produkte

Die nach Thioacidolyse von Lignin-artigen Polymeren aus Fichten-Suspensionskulturen und Keimlingen erhaltenen GC-Chromatogramme wiesen 10 Haupt-Peaks auf, die beispielhaft in einem Chromatogramm einer Probe des extrazellulären Polymers aus den Zellkulturen im Vergleich mit Lignin aus Fichtenholz markiert sind (Abb. 14).

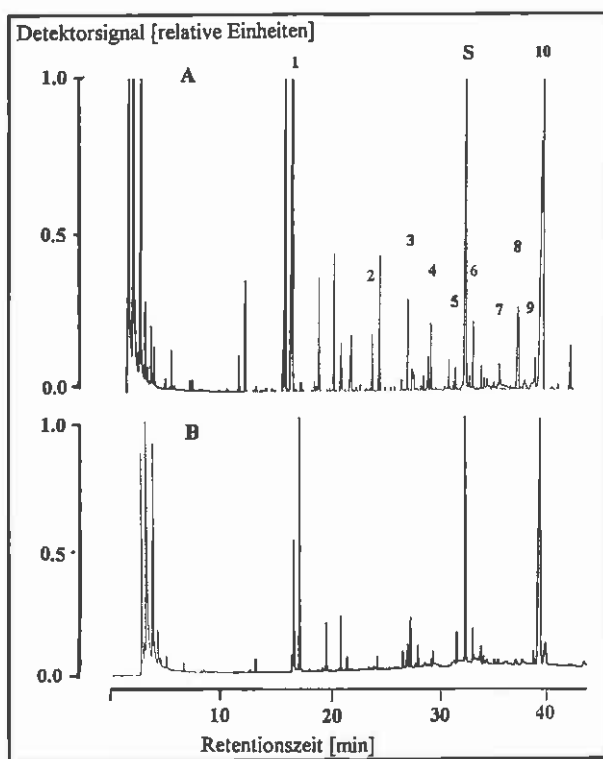
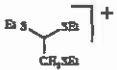
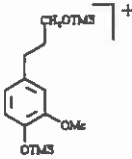
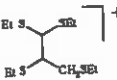
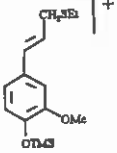


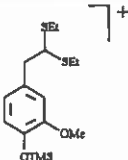
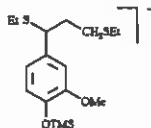
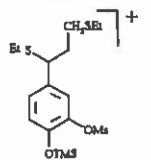
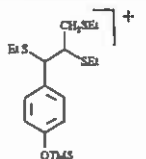
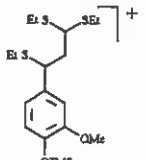
Abb. 14. Gaschromatogramm der silylierten Produkte einer Thioacidolyse des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (A) und Lignin aus Fichtenholz (B). Die Zuordnung der nummerierten Peaks ist in Tab. 5 zu finden. Der interne Standard (S) ist Docosan ($C_{22}H_{46}$).

Die massenspektrometrischen Daten der GC-Peaks und deren Zuordnung zu den entsprechenden Thioacidolyseprodukten sind in Tab. 5 zu finden.

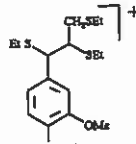
Tab. 5. Massenspektrometrische Charakterisierung monomerer Thioacidolyseprodukte (Verwendete Abkürzungen: M/z, Masse/Ladungs-Verhältnis; rel. Int., relative Intensität des Fragments; M⁺, Molekülpeak; TMS, Trimethylsilyl-Gruppe)

GC-Peak	Produkt	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
1	 Spaltprodukt aus aliphatischer Seitenkette	210 149 135 89 75 61	20 25 100 50 25 35	M ⁺ (Molpeak) M ⁺ - [SEt] M ⁺ - [CH ₂ SEt] M ⁺ - [2 x (SEt)] [CH ₂ SEt] ⁺ [SEt] ⁺
2	 aus Dihydroconiferylalkohol-Endgruppen	326 311 236 209 206 179 148 73	40 20 20 20 100 20 10 100	M ⁺ (Molpeak) M ⁺ - [CH ₃] M ⁺ - [TMS-OH] [G-CH ₂] ⁺ [TMS] ⁺
3	 Spaltprodukt aus aliphatischer Seitenkette	284 215 135 101 75	5 10 100 20 90	M ⁺ (Molpeak) [CH(SEt) ₂] ⁺
4	 aus Coniferylalkohol-Endgruppen	296 235 204 131 103 73	25 100 40 85 30 85	M ⁺ (Molpeak) M ⁺ - [TMS-OH] [TMS] ⁺

Fortsetzung I von Tab. 5.

GC-Peak	Produkt	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
5	 aus 8-O-4-Bindungen von Guajacyleinheiten	344 283 222 209 192 179 149 135 73	5 100 5 25 10 10 10 100 50	M^+ (Molpeak) $M^+ - [CH_2SEt]$ $M^+ - [2 \times (SEt)]$ $M^+ - [CH(SEt)_2]$ $[CH(SEt)_2]^+$ $[TMS]^+$
6	 aus cis-Coniferylalkohol-Endgruppen	358 297 235 75 73	5 20 15 100 20	M^+ (Molpeak) $M^+ - [SEt]$ $[CH_2SEt]^+$ $[TMS]^+$
7	 aus trans-Coniferylalkohol-Endgruppen	358 297 235 209 75 73	5 7 7 2 100 75	M^+ (Molpeak) $M^+ - [SEt]$ $[CH_2SEt]^+$ $[TMS]^+$
8	 aus 8-O-4-Bindungen von p-Hydroxyphenyleinheiten	388 239 75 73	2 100 45 40	M^+ (Molpeak) $M^+ - [TMS-OH] - [SEt]$ $[CH_2SEt]^+$ $[TMS]^+$
9	 aus Coniferylaldehyd-Endgruppen	418 295 269 135 73	3 5 100 45 45	M^+ (Molpeak) $M^+ - [CH_2CH(SEt)_2]$ $[CH(SEt)_2]^+$ $[TMS]^+$

Fortsetzung II von Tab. 5.

GC-Peak	Produkt	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
10	 aus β -O-4-Bindungen von Guajacyleinheiten	418	1	M^+ (Molpeak)
		403	2	$M^+ - [CH_3]$
		269	100	$M^+ - [CH(SEt)CH_2SEt]$
		75	25	$[CH_2SEt]^+$
		73	25	$M^+ - [CH_3]$

Vor der Analyse dimerer Thioacidolyseprodukte wurde die Reaktionsmischung mit Raney-Nickel desulfuriert. Dadurch verringern sich die Molekulargewichte der Produkte erheblich und die Interpretation der GC-Chromatogramme wird durch den Verlust der Chiralität an den C-Atomen der aliphatischen Seitenkette erleichtert. Ein Beispiel-Chromatogramm von silylierten Thioacidolyse-Dimeren ist in Abb. 15 gezeigt. Die Zuordnung der Peaks zu den strukturellen Ligninbausteinen ist Tab. 6 zu entnehmen.

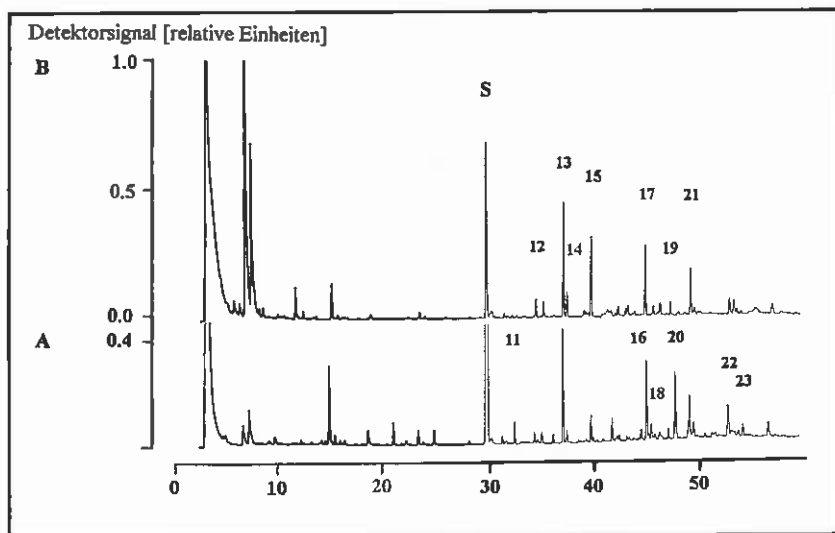
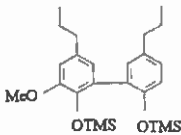
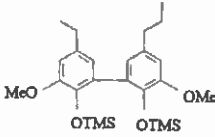
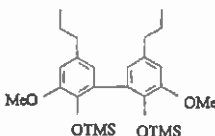
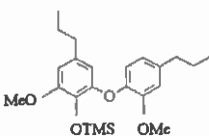
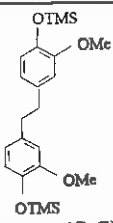
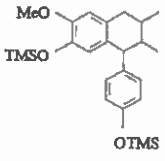
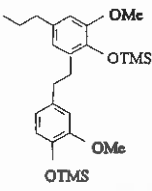
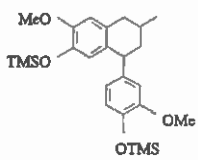


Abb. 15. Gaschromatogramm der silylierten Produkte einer Thioacidolyse mit nachfolgender Desulfurierung von (A) extrazellulärem Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen und (B) Lignin aus Fichtenholz. Die Zuordnung der nummerierten Peaks ist in Tab. 6 zu finden. Der interne Standard (S) ist Docosan ($C_{22}H_{46}$).

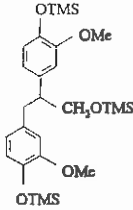
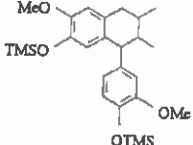
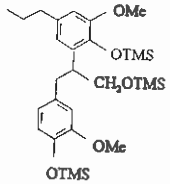
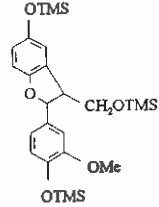
Tab. 6. Massenspektrometrische Charakterisierung dimerer Thioacidolyseprodukte nach Desulfurierung (Verwendete Abkürzungen siehe Tab. 5).

GC-Peak	Produkt	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
11	 5-5-Diaryl (H-G)-Dimer	444 429 415 147 73	33 9 12 7 100	M^+ (Molpeak) $M^+ - [CH_3]$ $M^+ - [CH_2CH_3]$ $M^+ - [C_9H_{10}O \text{ (Aryl 2)}]$ $- [TMS]$ $[TMS]^+$
12	 5-5-Diaryl (G-G)-Dimer	460 445 430 178 73	46 17 9 6 100	M^+ (Molpeak) $M^+ - [CH_3]$ $M^+ - [CH_2CH_3]$ $M^+ - [C_{10}H_{13}O_2 \text{ (Aryl 2)}]$ $- [OCH_3] - [TMS] - [CH_3]$ $[TMS]^+$
13	 5-5-Diaryl (G-G)-Dimer	474 459 444 178 73	36 10 5 4 100	M^+ (Molpeak) $M^+ - [CH_3]$ $M^+ - [CH_2CH_3]$ $M^+ - [C_{10}H_{13}O_2 \text{ (Aryl 2)}]$ $- [OCH_3] - [TMS] - [CH_2CH_3]$ $[TMS]^+$
14	 4-O-5-Diarylether (G-G)-Dimer	402 387 373 343 209 179 157 73	100 42 31 10 9 13 36 79	M^+ (Molpeak) $M^+ - [CH_3]$ $M^+ - [CH_2CH_3]$ $M^+ - [2 \times (CH_2CH_3)]$ $M^+ - [C_{10}H_{13}O_2 \text{ (Aryl 2)}]$ $- [CH_2CH_3]$ $M^+ - [C_{10}H_{13}O_2 \text{ (Aryl 2)}]$ $- [OCH_3] - [CH_2CH_3]$ $[TMS]^+$

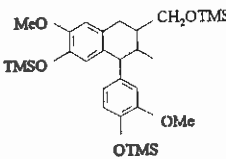
Fortsetzung I von Tab. 6.

GC-Peak	Produkt	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
15	 β-1-Diarylpropan (G-G)-Dimer	418 209 179 73	12 100 9 62	M^+ (Molpeak) $M^+ - [C_8H_8O_2 \text{ (Aryl 2)}]$ $- [TMS]$ $M^+ - [C_8H_8O_2 \text{ (Aryl 2)}]$ $- [OCH_3] - [TMS]$ $[TMS]^+$
16	 β-B-Pinoresinol (H-G)-Dimer	442 385 355 198 170 73	84 15 19 11 18 100	M^+ (Molpeak) $M^+ - [CH_2CH_3] - [CH_3]$ $M^+ - [CH_2CH_3] - [CH_3]$ $- [OCH_3]$ $[TMS]^+$
17	 B-5-Phenylcumaran (G-G)-Dimer	460 251 209 179 73	25 11 100 11 82	M^+ (Molpeak) $M^+ - [C_8H_9O_2 \text{ (Aryl 1)}]$ $- [TMS]$ $M^+ - [C_9H_{11}O_2 \text{ (Aryl 2)}]$ $- [TMS]$ $M^+ - [C_9H_{11}O_2 \text{ (Aryl 2)}]$ $- [OCH_3] - [TMS] - [CH_2CH_3]$ $[TMS]^+$
18	 β-B-Pinoresinol (G-G)-Dimer	458 428 385 262 209 179 73	65 9 29 16 40 44 100	M^+ (Molpeak) $M^+ - [OCH_3]$ $M^+ - [CH_2CH_2CH_3]$ $- [OCH_3]$ $M^+ - [C_{11}H_{13}O_2 \text{ (Aryl 2 + Seitenkette)}]$ $- [TMS]$ $M^+ - [C_{11}H_{13}O_2 \text{ (Aryl 2 + Seitenkette)}]$ $- [TMS] - [OCH_3]$ $[TMS]^+$

Fortsetzung II von Tab. 6

GC-Peak	Produkt	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
19	 B-1-Diarylpropan (G-G)-Dimer	520	8	M ⁺ (Molpeak)
		311	63	M ⁺ - [C ₈ H ₉ O ₂ (Aryl 1)] - [TMS]
		209	18	M ⁺ - [C ₉ H ₉ O ₃ (Aryl 2)] - [TMS]
		179	8	M ⁺ - [C ₉ H ₉ O ₃ (Aryl 2)] - [TMS] - [OCH ₃]
		149	9	M ⁺ - [C ₈ H ₉ O ₂ (Aryl 1)] - [TMS] - [OCH ₃]
		73	100	[TMS] ⁺
20	 B-β-Pinoresinol (G-G)-Dimer	472	65	M ⁺ (Molpeak)
		385	34	M ⁺ - [(CH ₃) ₂ CHCH ₂] - [OCH ₃]
		276	8	M ⁺ - [C ₁₂ H ₁₄ O ₂ (Aryl 2 + Seitenkette)] - [TMS] - [OCH ₃]
		178	15	M ⁺ - [C ₁₂ H ₁₄ O ₂ (Aryl 2 + Seitenkette)] - [TMS] - [OCH ₃]
		73	100	[TMS] ⁺
21	 B-5-Phenylcumaran (G-G)-Dimer	562	12	M ⁺ (Molpeak)
		352	5	M ⁺ - [C ₈ H ₉ O ₂ (Aryl 1)] - [TMS]
		263	5	M ⁺ - [C ₈ H ₉ O ₂ (Aryl 1)] - [TMS] - [TMS-OH]
		209	29	M ⁺ - [C ₉ H ₁₁ O ₂ (Aryl 2)] - [OCH ₃] - [TMS] - [CH ₂ CH ₃]
		191	29	M ⁺ - [C ₈ H ₉ O ₂ (Aryl 1)] - [2 x TMS]
		179	6	M ⁺ - [C ₁₁ H ₁₃ O ₃ (Aryl 2 + Seitenkette)] - [2 x TMS] - [OCH ₃]
		149	5	M ⁺ - [C ₉ H ₁₁ O ₃ (Aryl 1 + Seitenkette)] - [2 x TMS]
		73	100	[TMS] ⁺
22	 B-5-Diaryl (H-G)-Dimer	488	14	M ⁺ (Molpeak)
		458	5	M ⁺ - [OCH ₃]
		398	57	M ⁺ - [TMS-OH]
		368	9	M ⁺ - [OCH ₃] - [TMS-OH]
		209	7	M ⁺ - [C ₁₁ H ₁₃ O ₂ (Aryl 2 + Seitenkette)] - [TMS]
		73	100	[TMS] ⁺

Fortsetzung III von Tab. 6.

GC-Peak	Produkt	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
23		560	12	M ⁺ (Molpeak)
		470	9	M ⁺ - [TMS-OH]
		439	45	M ⁺ - [C ₇ H ₅ O ₂ (Aryl 1)] - [TMS]
		209	8	M ⁺ - [C ₁₂ H ₁₄ O ₃ (Aryl 2 + Seitenkette)] - [2 x TMS]
		179	7	M ⁺ - [C ₁₃ H ₁₄ O ₃ (Aryl 2 + Seitenkette)] - [2 x TMS] - [OCH ₃]
		73	100	[TMS] ⁺
	β-β-Pinoresinol (G-G)-Dimer			

10.2 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Für die NMR-Spektroskopie wurden die freien Hydroxylgruppen der Proben acetyliert. Dazu wurden 50-150 mg des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen bzw. Milled Wood Lignin in einer Mischung von jeweils 2 ml Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Pyridin suspendiert. Es wurde für 24 h unter Lichtausschluß bei 23°C gerührt, 10 ml Ethanol wurden zugegeben und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach viermaliger Zugabe von Ethanol und anschließender Evakuierung wurde das Produkt im evakuierten Exsikkator über Natriumsulfat getrocknet. Für die NMR-Spektroskopie wurde der Rückstand einen Tag bei 30°C in 1.5 ml d₆-Dimethylsulfoxid gerührt, die Mischung zentrifugiert (15 min, Swing Out-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen) und der Überstand in ein NMR-Röhrchen überführt (Löslichkeit des Polymers in Dimethylsulfoxid ca. 23 % laut LTGA-Methode; s. III 1.2.1). Sämtliche ¹H-NMR-Spektren wurden bei 303 K mit einem AC 400-Spektrometer der Firma Bruker (Karlsruhe) mit Methanol (3.30 ppm) als interner Referenz aufgenommen (Details s. II 15.4.2).

10.3 Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)

Von den polymeren Proben wurde eine im Achatmörser gut homogenisierte Mischung mit Kaliumbromid (10 % Probenanteil; w/w) bei 10 atm zu einem Pellet gepreßt. Die Spektren wurden im Bereich zwischen 370 und 4000 cm⁻¹ mit einem FT-IR-Spektrometer (System 2000, Perkin-Elmer, Beaconsfield, Großbritannien) nach Nullabgleich gegen Luft aufgenommen.

10.4 Elementaranalyse

Zur Elementaranalyse, die freundlicherweise von Dr. H. Lerche und S. Fritsch (Institut für

Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München) durchgeführt wurde, wurden 2-10 mg des trockenen ligninartigen Material eingewogen und in einem CHN-O-Rapid-Analysator (Heraeus, Hanau) unter kontrollierten Bedingungen verbrannt. Der Sauerstoffgehalt wurde durch Differenzbildung aus der Kohlenstoff-, Wasserstoff und Stickstoff-Analyse ermittelt.

10.5 Zuckeranalyse

Anthron-Methode zur Neutralzuckerbestimmung

(verändert nach Ayers et al. 1976)

Etwa 10 mg des ligninartigen Polymers wurden in ein 10 ml Regenzglas eingewogen und mit einer frisch angesetzten Mischung von 750 μ l 16 M Schwefelsäure und 6 ml bidest. Wasser versetzt. Die Mischung wurde für 5 min auf 90°C erwärmt und 1 ml davon in ein 10 ml Reagenzglas mit Schraubdeckel (Pyrex, Bender und Hobein, München) überführt. Dann wurden 5 ml Anthronreagens (50 mg Anthron (Merck, Darmstadt) und 1 g Thioharnstoff in 100 ml 13 M Schwefelsäure) zugegeben. Nach Verschließen des Reaktionsgefäßes wurde im Wasserbad für 15 min auf 95°C erhitzt, 15 min auf Eis abgekühlt, die Mischung zentrifugiert (5 min Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen) und die Absorption des Überstands bei 620 nm gemessen. Mit verschiedenen Glucosekonzentrationen wurde eine Eichgerade erstellt (Abb. 16). Der Zuckergehalt einer Probe wurde demnach in eine Glucoseäquivalentkonzentration umgerechnet.

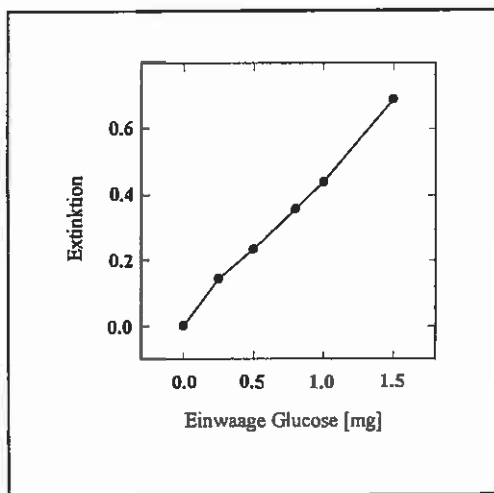


Abb. 16. Eichkurve für die Quantifizierung von Neutralzuckern. Dazu wurden verschiedene Mengen Glucose der Anthron-Methode unterzogen und die Absorption der Reaktionsprodukte bei 620 nm im Photometer gemessen.

Uronsäurebestimmung

(verändert nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973)

Etwa 5 mg extrazelluläres Polymer wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Eiskühlung mit 200 µl bidest. Wasser und 1.2 ml einer 12.5 mM Lösung von Natriumtetraborat (Fluka, Neu-Ulm) in konz. Schwefelsäure (jeweils frisch angesetzt) versetzt, gut durchmischt und für 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis und Zugabe von 20 µl einer 0.5 %igen (w/v) Natriumhydroxidlösung wurde 5 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, Hettich, Tuttingen) und die Extinktion des Überstands bei 520 nm gegen einen Leerwert bestimmt (A_{520} 1). Die Proben wurden dann mit 20 µl einer frisch bereiteten Lösung von 0.15 % (w/v) 3-Hydroxybiphenyl (Fluka, Neu-Ulm) in 0.5 % (w/v) Natriumhydroxid versetzt und 5 min geschüttelt (IKA-VIBRAX-VXR, Janke und Kunkel, Staufen). Dann wurde nochmals die Extinktion der Mischung bei 520 nm gemessen (A_{520} 2). Die Differenz der beiden Messungen (A_{520} 2 - A_{520} 1) bildete den Meßwert, der mit den Werten einer Eichkurve von Galacturonsäure (Abb. 17) verglichen wurde.

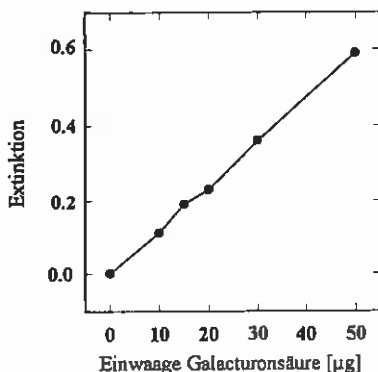


Abb. 17. Eichkurve für die Quantifizierung von Uronsäuren. Dazu wurden verschiedene Mengen Galacturonsäure der Bestimmungsmethode nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen unterzogen und die Absorption der Reaktionsprodukte bei 520 nm im Photometer gemessen.

Analyse der Monosaccharidzusammensetzung

(nach Fengel und Wegener 1979)

Etwa 10 mg ligninartiges Polymer wurden in einem 50 ml Rundkolben mit 8 ml Trifluoressigsäure (TFA) versetzt und für 1 min mit einem Ultraschallstab behandelt (Branson B-12, Bachofer, Reutlingen). Die Suspension wurde nach Verschließen des Kolbens mit

einem Schliffstopfen über Nacht gequollen. Die Mischung wurde im Siliconölbäd für 55 min auf 125°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die TFA wurde durch Zugabe von 1.5 ml bidest. Wasser auf 85 % verdünnt und für weitere 15 min auf 125°C erwärmt. Anschließend wurden 14.5 ml bidest. Wasser zugegeben, wodurch die TFA auf 30 % verdünnt wurde. Dann wurde die Mischung zwei Stunden auf 125°C erhitzt. Die TFA wurde im Vakuum am Rotationsverdampfer (Büchi, Flawil, Schweiz) entfernt und der Rückstand zweimal mit 10 ml Wasser nachgewaschen. Die Probe wurde über Nacht gefriergetrocknet (LYCOVAC GT 2, Leybold-Heraeus, Köln). Die Monosaccharid-Zusammensetzung wurde durch eine automatische Zuckeranalyse (Zuckeranalysator LC 2000, Biotronik, Hamburg) im Labor von Prof. Fengel (Institut für Holzforschung der Universität München) ermittelt.

10.6 Aminosäureanalyse

(nach Eulitz et al. 1991)

Die Aminosäureanalyse des extrazellulären ligninartigen Polymers wurde von Dr. M. Eulitz (Institut für Klinische Molekularbiologie der GSF) durchgeführt. Dazu wurden ca. 5 mg des Polymers in verschraubbaren und zuvor evakuierten Glasgefäßen für 24 h bei 105°C in permanent siedender 6 M Salzsäure hydrolysiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Das verbleibende Hydrolysat wurde in einer 1 mM Lösung von EDTA in 0.1 M Kalium-phosphat gelöst und derivatisiert (EBI 420 A Derivatizer, Applied Biosystems, Weiterstadt). Die dabei entstehenden Phenylthiocarbamoyl-Derivate der Aminosäuren wurden mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie getrennt und bei 280 nm detektiert. Unter den gewählten hydrolytischen Bedingungen wurden Tryptophan, Cystein und Methionin zerstört.

10.7 Gelpermeationschromatographie

(High Performance Size Exclusion Chromatography; HPSEC)

Etwa 1-5 mg der polymeren Proben wurden in 1 ml 0.1 M NaOH (wäßriges Laufmittelsystem) bzw. in 1 ml 0.1 M LiCl in Dimethylformamid (organisches Laufmittelsystem) suspendiert und bei 23°C über Nacht gerührt. Anschließend wurde zentrifugiert (2000 rpm, 15 min, Swing Out-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen) und 10-100 µl vom Überstand auf die Probeschleife der HPSEC-Anlage injiziert.

Abb. 18. Eichkurve zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von Polymeren mittels HPSEC im wäßrigen Laufmittelsystem (Mittelwert aus drei Messungen $\pm$ SA). Standards: Natriumpolystyrolsulfonat.

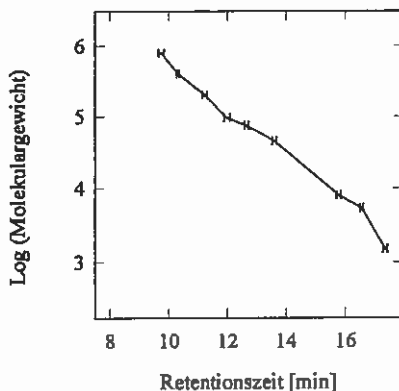
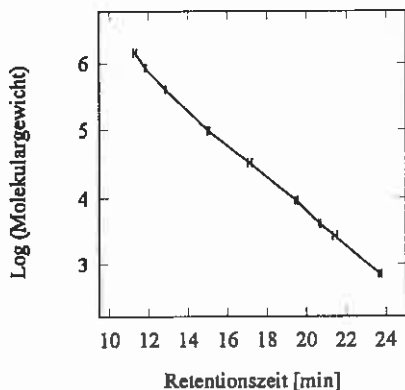


Abb. 19. Eichkurve zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von Polymeren mittels HPSEC im organischen Laufmittelsystem (Mittelwert aus drei Messungen $\pm$ SA). Standards: Polystyrol.



11. Analyse des Peroxidase-Isoenzymusters

11.1 Proteinextraktion

Proteine wurden aus dem Medium der Suspensionskulturen, den mit CaCl_2 -gewaschenen Zellen (ionisch-gebundene Enzyme) und dem Zellrest (zelluläre Enzyme) extrahiert. Die Aufarbeitung wurde entsprechend folgender Quellen adaptiert: Bruce und West (1989), Graham und Graham (1991), McDougall (1991) und Fry (1988). Dabei wurde nach dem in

Abb. 20 zeigte das Aufarbeitungsschema verfahren. Für die Enzymextraktionen wurden die folgenden Pufferlösungen verwendet:

Pufferlösungen

<i>POD-Waschpuffer</i>
50 mM Essigsäure, 100 mM CaCl_2 , mit 1 M NaOH auf pH 5.5 eingestellt
<i>POD-Aufschlußpuffer</i>
100 mM TRIS, 100 mM MES, 50 mM CaCl_2 , mit 1 M HCl auf pH 7 eingestellt
<i>POD-Puffer</i>
25 mM Essigsäure, 50 mM CaCl_2 , mit 1 M NaOH auf pH 5.5 eingestellt

Zellen und Medium der Fichten-Suspensionskulturen wurden durch Filtration über Filterpapier (Schleicher und Schüll, Dassel) voneinander getrennt. Das Filtrat (1) wurde zum Entsalzen in 2 ml Portionen auf PD-10-Säulen (Pharmacia, Freiburg) aufgegeben und mit jeweils 3.5 ml POD-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in kleinere Volumina portioniert und nach Kühlung in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert (extrazelluläre PODs). Die PD-10-Säulen wurden nach jedem Lauf mit dem 10-fachen Säulenvolumen gespült. Der nach Filtration erhaltene Zellrest (1) wurde in POD-Waschpuffer gegeben (3 ml pro g Frischgewicht des Zellmaterials) und 10 min bei 23°C gerührt.

Nach Filtration wie oben angegeben wurde das Filtrat (2) über PD-10-Säulen entsalzt (s.o.), im Eluat die ionisch an die Zellwand gebundenen PODs erhalten und nach Vorbehandlung (s.o.) bei -80°C gelagert. Der Zellrückstand (2) wurde in POD-Aufschlußpuffer (3 ml pro g Frischgewicht) mit Hilfe eines Ultraschallstabs (Bachofer, Reutlingen) unter Eiskühlung suspendiert. Die Mischung wurde für 10 min bei 23°C gerührt, dann wurden 1.8 ml der Zell-Suspension mit Hilfe einer am unteren Ende abgeschnittenen Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen).

Der Überstand (3) wurde wie o.a. über PD-10-Säulen entsalzt. Mit dem Eluat wurden zelluläre PODs gewonnen und wie o.a. vorbehandelt und gelagert. Zur Extraktion der kovalent an die Zellwand gebundenen PODs wurde der Zellrest (3) einem enzymatischen Zellwand-Verdau in 2 ml einer Lösung von Cellulase (500 U) und Pectinase (500 U) in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 6.5) unterzogen (18 h bei 30°C).

Anschließend wurde zentrifugiert (s.o.) und das Filtrat (4) entsalzt (s.o.). Das Eluat der PD-10-Säulen (kovalent-gebundene PODs) wurde portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

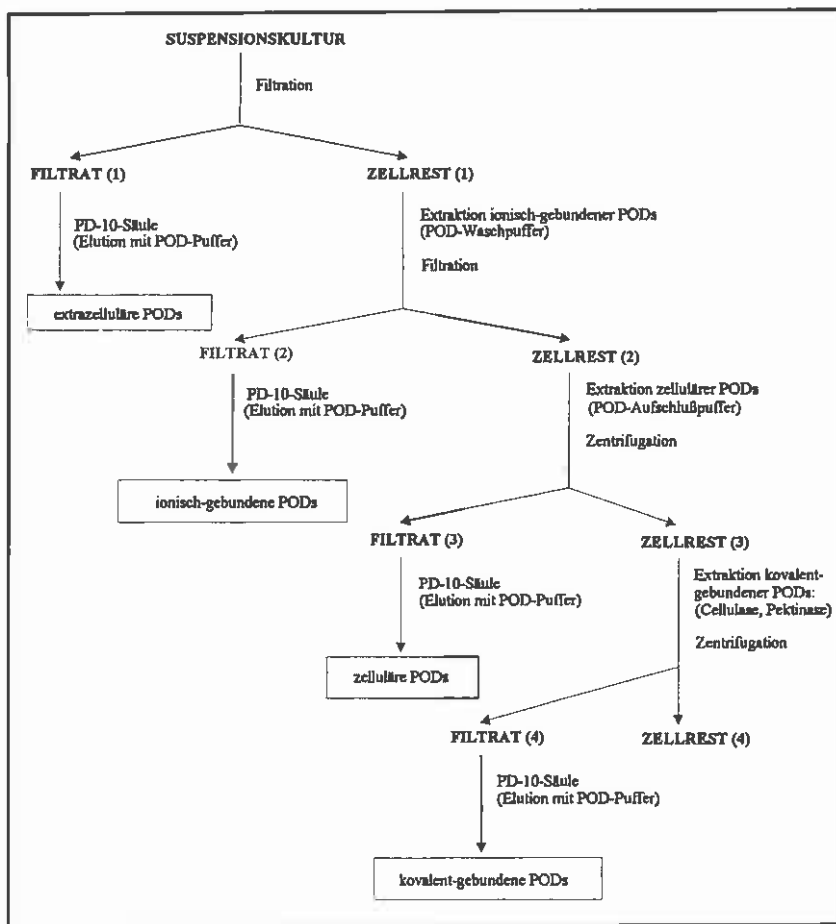


Abb. 20. Schema zur Extraktion von Enzymen aus Fichten-Suspensionskulturen.

11.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

11.2.1 Gelapparatur

Zur Trennung von Peroxidase-Isoenzymen mittels PAGE wurde eine Gelapparatur der Firma Biometra (Göttingen) verwendet. Das Sammelgel hatte eine Länge von 2 cm, das Trenngel von 6 cm. Die Gele hatten eine Dicke von 1 mm.

11.2.2 Gelzusammensetzung

Anodische PAGE (nach Davis 1964; Trennung bei pH 8.3)

Gelart	Lösung	Menge [µl]
<i>Sammelgel</i> (3.75 %) (für eine Gelkassette)	Acrylamid/Bisacrylamid 30 : 0.8	412
	0.5 M Tris (pH 6.8)	625
	bidest. Wasser	1500
	TEMED	3
	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	25
<i>Trenngel</i> (7.5 %) (für eine Gelkassette)	Acrylamid/Bisacrylamid 30 : 0.8	2250
	0.5 M Tris (pH 6.8)	3375
	bidest. Wasser	3840
	50 % (v/v) Glycerin	225
	TEMED	7.5
	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	45
<i>Elektrodenpuffer</i>	3 g Tris 14.4 g Glycin bidest. Wasser	auffüllen auf 1000 ml
<i>Probenpuffer</i>	Glycerin	5 ml
	Elektrodenpuffer (s.o.)	2 ml
	5 % (w/v) Bromphenolblau	200 µl

Kathodische PAGE (nach Reisfeld et al. 1962; Trennung bei pH 3.8)

Gelart	Lösung	Menge [µl]
<i>Sammelgel</i> (3.75 %) (für eine Gelkassette)	Acrylamid/Bisacrylamid 30 : 0.8	750
	1 M KOH	180
	100 % Essigsäure	20
	TEMED	5
	1.4 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	250
	bidest. Wasser	1700
<i>Trenngel</i> (7.5 %) (für eine Gelkassette)	Acrylamid/Bisacrylamid 30:0.8	2500
	1M KOH	600
	100 % Essigsäure	200
	TEMED	10
	1.4 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	1000
	bidest. Wasser	3500
<i>Elektrodenpuffer</i>	100 % Essigsäure	0.7 ml
	ß-Alanin	3.12 g
	bidest. Wasser pH-Wert mit Eisessig auf 4.5 einstellen	auffüllen auf 1000 ml
<i>Probenpuffer</i>	Glycerin	5 ml
	Elektrodenpuffer (s.o.)	2 ml
	5 % (w/v) Methylgrün	200 µl

11.2.3 Auftrennung der Isoenzyme

Von den Proteinextrakten (siehe II 11.1) wurde ein Volumen entsprechend einer Proteinmenge von 25 µg (Bestimmung der Proteinmenge siehe II 14.1) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit $\frac{1}{3}$ dieses Volumens Probenpuffer versetzt. Die erhaltene Mischung wurde quantitativ in die Geltaschen (Volumen der Geltaschen 25 µl) überführt. Die Auftrennung der Peroxidase-Isoenzyme erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

	Anionische PAGE	Kationische PAGE
Stromstärke [mA]	20	20
Spannung [V]	100	150
Temperatur	10°C	10°C

Die Elektrophorese wurde im allgemeinen 30 min nachdem der jeweilige Markerfarbstoff aus dem Gel eluiert war, gestoppt.

11.3 Bestimmung des Isoelektrischen Punktes

Zur Trennung der Peroxidase-Isoenzyme mittels IEF-Gelelektrophorese wurde das Phast-System® der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet. Dazu wurden 4 µl der Enzymextrakte (s. II 11.1) über einen Probenkamm auf IEF-Fertiggele (Bestellnummer 17-0543-01; Pharmacia, Freiburg) aufgetragen und die Elektrophorese nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Färbung

Die Gele wurden mit bidest. Wasser gewaschen, Banden mit Peroxidase-Aktivität durch eine Farbreaktion (s. II 11.4) sichtbar gemacht und die Gele anschließend in 20 % (v/v) Glycerin gelegt. Zum Trocknen wurden die Gele in eine Lage Einmachfolie (Melitta, Minden) eingewickelt und im Dunklen an der Luft getrocknet. Eine Quantifizierung der Aktivität erfolgte nicht. Als Marker für den Isoelektrischen Punkt diente eine Proteinmischung (Katalog-Nr. 161-0310, Bio-Rad München). Die Gelbanden der Markerproteine wurden durch eine Silberfärbung (verändert nach Blum et al. 1987) bräunlich angefärbt. Dazu wurde nach dem in Tab. 7 beschriebenen Procedere verfahren. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Gele jeweils mit bidest. Wasser gründlich gewaschen.

Tab. 7. Anfärbung von Proteinen mittels Silberfärbung (verändert nach Blum et al. 1987).

Färbungsschritt	Inkubationslösung	Inkubationszeit [min]
1	20 % Trichloressigsäure	10
2	10 % Essigsäure + 50 % Methanol	60
3	30 % Ethanol	30
4	0.02 % Natriumthiosulfat	1
5	0.2 % Silbernitrat + 0.015 % Formaldehyd	20
6	6 % Natriumcarbonat + 0.05 % Formaldehyd + 2 % Natriumthiosulfatlösung (siehe Nr. 4)	je nach Intensität der Banden
7	18 % Essigsäure + 50 % Methanol	5-10
8	20 % Glycerin	12 Stunden

11.4 Quantitativer Nachweis der Peroxidase-Aktivität im Gel

Die POD-Isoenzyme wurden im Gel über ihre enzymatische Aktivität angefärbt. Das polymere Produkt der Reaktion färbt das Gel an Stellen mit POD-Aktivität bräunlich. Die Intensität der Färbung mit Benzidin/Guajacol (Schrauben 1966) ist proportional zur Enzymaktivität.

Benzidin/Guajacol-Färbung

0.2 M Natriumacetat-Lösung	40 ml
5 mM Mangansulfat-Lösung	4 ml
0.35 % (v/v) Wasserstoffperoxid-Lösung	4 ml
Benzidin/Guajacol-Lösung	10 ml
20 mg Benzidin	
10 ml 10% (v/v) Essigsäure	
54 µl Guajacol	

Benzidin wurde wegen der schlechten Löslichkeit 15 min vor dem Zusammengeben sämtlicher Lösungen des Färbereagens' zur 10 %igen Essigsäure gegeben. Die einzelnen Stammlösungen wurden maximal zwei Monate bei 4°C gelagert. Für die Färbung wurde das Färbereagens stets frisch angesetzt. Die Gele wurden 30 min inkubiert, die Färbereaktion wurde durch Eintauchen der Gele für 1 h in 2 % (v/v) Essigsäure gestoppt und die Gele wurden 16 h in 10 % (v/v) Glycerin stehengelassen. Die Gele wurden im feuchten Zustand blasenfrei in Einmachfolie (Melitta, Minden) eingewickelt und auf dem Gelrockner für 2 h getrocknet. Die Quantifizierung der Aktivität der Peroxidase-Isoenzyme erfolgte durch Messung der Transmission der entsprechenden Gelbanden bei 420 nm mit Hilfe eines Desitometers (CD 60, Desaga, Heidelberg).

12. Inhibition von Peroxidasen und Laccasen in Fichten-Suspensionskulturen

Zur Inhibition von Peroxidasen der Fichten-Suspensionskulturen wurden zwei verschiedene Konzentrationen (0.005 M und 0.01 M) n-Propylgallat (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. Laccasen wurde mittels Zugabe von 0.005 M und 0.01 M Diethyldithiocarbaminsäure (Sigma, Deisenhofen) inhibiert. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte als konzentrierte Lösung in Methanol (200 mg pro 500 µl).

13. *In vitro*-Synthese von Ligninen (Dehydrierungspolymerisate; DHPs)

Für die *in vitro*-Polymerisation von Hydroxymethylalkoholen (DHP-Synthese) wurde die in Abb. 21 gezeigte Versuchsanordnung verwendet.

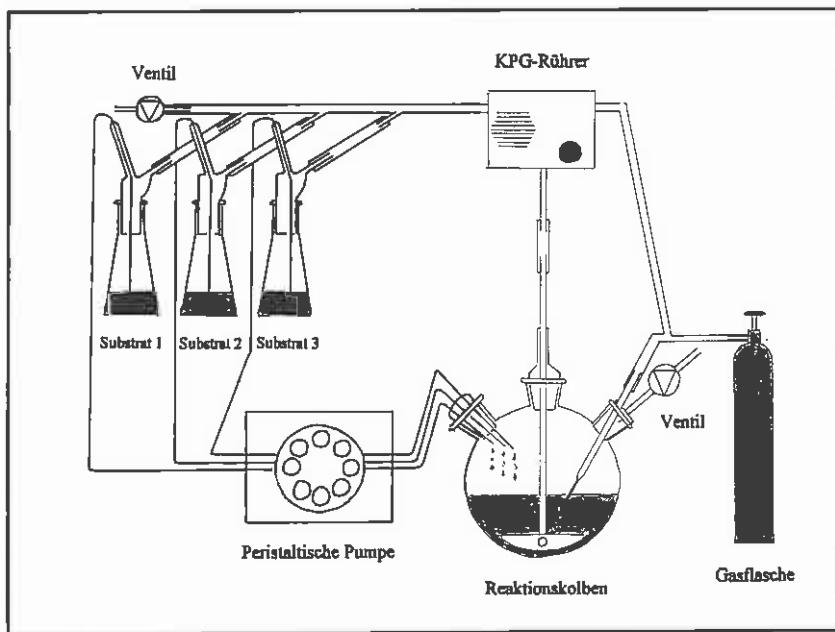


Abb. 21. Versuchsanordnung zur DHP-Synthese.

Sämtliche Synthesen wurden in 0.1 M Natriumphosphatpuffer (Sauerstoff-frei; pH 6.5) bei Raumtemperatur durchgeführt und, mit Ausnahme der DHPs 2, 4 und 6 (s. Tab. 8), unter Stickstoff-Atmosphäre. Die Zutropfgeschwindigkeit betrug 4-8 ml·h⁻¹, die Gesamtreaktions-

zeit 24 h. Die Polymerisation wurde entweder durch käufliche Meerrettich-Peroxidase (M-POD; Boehringer, Mannheim) oder durch Enzympräparationen aus Fichten-Suspensionskulturen katalysiert. Die bei den unterschiedlichen Versuchsansätzen verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tab. 8 zusammengefaßt:

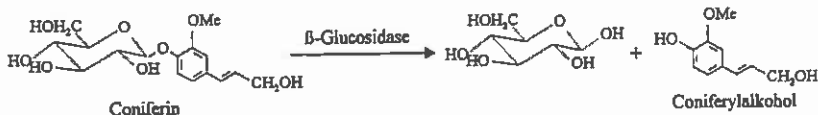
Tab. 8. Übersicht über DHP-Synthesen (Legende unterhalb der Tabelle).

DHP	Substrat 1 [mmol / x ml]	Substrat 2 [mmol / x ml]	Substrat 3 [mmol / x ml]	Enzyme [Units / x ml]
1	CA 1.11 / 150	-	H ₂ O ₂ 1.40 / 150	M-POD 550 / 75
2	CA 0.55 / 150	-	Glc 0.60 / 150	M-POD 550, GO 750 / 75
3	Con 0.40 / 150	-	H ₂ O ₂ 0.70 / 150	M-POD 275, B-Glc 600-900 / 75
4	Con 0.44 / 150	-	Glc 0.44 / 150	M-POD 700, GO 800, B-Glc 1000-1500 / 150
5	CA 1.11 / 150	pCA 0.20 / 150	H ₂ O ₂ 1.40 / 150	M-POD 550 / 75
6	CA 1.11 / 150	pCA 0.20 / 150	Glc 1.20 / 150	M-POD 550, GO 950 / 150
7	Con 0.47 / 75	pCA 0.087 / 75	H ₂ O ₂ 0.70 / 75	M-POD 320, B-Glc 500-75 / 75
8	CA 0.55 / 150	-	H ₂ O ₂ 0.70 / 150	Medium-PODs (200 ml Medium)
9	CA 0.55 / 150	-	H ₂ O ₂ 0.70 / 150	PODs Zellen (von 25 g Zellen in 100 ml Puffer (siehe 11.1))
10	CA 0.55 / 150	-	H ₂ O ₂ 0.70 / 150	PODs Zellwand (von 25 g Zellen in 100 ml Puffer (siehe 11.1))
11	CA 0.55 / 75	pCA 0.087 / 75	H ₂ O ₂ 0.70 / 75	Medium-PODs (200ml Medium)
12	CA 0.55 / 75	pCA 0.087 / 75	H ₂ O ₂ 0.70 / 75	PODs Zellen (von 25 g Zellen in 100 ml Puffer (siehe 11.1))
13	CA 0.55 / 75	pCA 0.087 / 75	H ₂ O ₂ 0.70 / 75	PODs Zellwand (von 25 g Zellen in 100 ml Puffer (siehe 11.1))

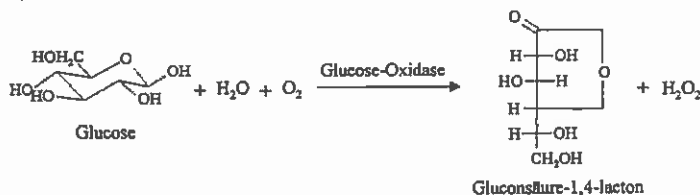
Abkürzungen: CA, Coniferylalkohol; pCA, *p*-Cumarylalkohol; Con, Coniferin; B-Glc, B-Glucosidase (Sigma, Deisenhofen); GO, Glucose-Oxidase (Boehringer Mannheim); M-POD, Meerrettich-Peroxidase (Boehringer, Mannheim).

Demnach wurden z.B. für die Synthese von DHP 1 1.11 mmol Coniferylalkohol in 150 ml Puffer (Substrat 1) und 1.4 mmol Wasserstoffperoxid in 150 ml Puffer (Substrat 2) zu 550 U Peroxidase in 75 ml Puffer (Enzymlösung) zutropft. Die Reaktionsbedingungen bei der Synthese der weiteren DHPs sind Tab. 8 analog zu entnehmen. Die Polymere wurden nach Abschluß der Synthese mit jeweils 200 ml 1 % SDS (w/v), 1 M NaCl und bidest. Wasser (dreimal) gewaschen, indem für 10 min inkubiert und anschließend für 25 min bei 15000 x g zentrifugiert (Zentrifuge J2-21, Beckman, München; Rotor JA 14, Beckman, München) wurde. Das nach der Reinigung erhaltene Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und 24 h gefriergetrocknet (LYCOVAC GT 2, Leybold-Heraeus, Köln). Neben dem klassischen Reaktionsansatz (Freudenberg 1968) mit Coniferylalkohol, Wasserstoffperoxid und M-POD, wurden Copolymerisate mit *p*-Cumarylalkohol als weiterem Monolignol hergestellt (DHPs 5-7, 11-13). Um eine möglichst geringe aktuelle Konzentration der Substrate während der DHP-

Synthese sicherzustellen, wurden Ansätze verwendet, in denen die Substrate *in situ* enzymatisch gebildet wurden. Coniferin fand als biosynthetische Vorstufe von Coniferylalkohol Verwendung (DHPs 3, 4, 7), aus welchem *in situ* durch Einwirkung einer β -Glucosidase (Sigma, Deisenhofen) nach dem folgenden Reaktionsschema das entsprechende Monolignol freigesetzt wurde:



Des weiteren wurde das System Glucose/Glucose-Oxidase (Boehringer, Mannheim) zur *in situ*-Erzeugung von Wasserstoffperoxid eingesetzt, wobei Sauerstoff direkt in die Reaktionslösung eingeleitet wurde (DHPs 2, 4, 6). Die Geschwindigkeit der Glucose-Oxidation wurde durch langsames Einleiten des Sauerstoffs in die Reaktionslösung (60 Blasen pro Minute) reduziert:



14. Messung von Enzymaktivitäten

14.1 Proteinextraktion

Für die Bestimmung der Aktivität von Zimtalkohol-Dehydrogenase wurde das Pflanzenmaterial (ca. 100 mg) in einem eisgekühlten Mörser mit 0.5 g Quarzsand und 2 ml Aufschlußpuffer (20 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)-KOH, pH 8.2, 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP-10), 1 mM Dithioerythritol (DTE)) homogenisiert. Der Puffer wurde vor Zugabe des DTE durch kurzes Aufkochen und Abkühlen auf Eis unter Einleiten von Stickstoff entgast. Die DTE-Lösung wurde immer frisch zubereitet. Nach Zentrifugation des Homogenats (10 min bei 4°C, 15000 x g; Zentrifuge 3K 12, Sigma, Osterode) wurde der Überstand als Rohextrakt für die Messungen von Enzymaktivitäten verwendet. Die verschiedenen Enzymaktivitäten wurden auf Frischgewicht oder Gesamtprotein bezogen. Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte nach Bradford (1976). Das käufliche Protein-Nachweisreagens (enthält Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R 250; Bio-Rad, München) bildet mit Proteinen einen farbigen Komplex, dessen Absorption bei 595 nm

photometrisch bestimmt wird. Die Farbintensität ist proportional zur Proteinmenge. Als Standards für eine Eichkurve dienten verschiedene Konzentrationen von gereinigtem Albumin aus Rinderserum (Merck, Darmstadt). Enzymextrakte für die Bestimmung der Gesamt-Peroxidase (POD)-Aktivität in Fichten-Keimlingen wurden durch Homogenisieren von ca. 50 mg Keimlingsmaterial mit 0.2 g Quarzsand in 200 µl 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.5) in einem eisgekühlten Mörser und anschließender Zentrifugation bei 15000 x g für 5 min (Zentrifuge 3K 12, Sigma, Osterode) als Überstand erhalten. Die Enzymextrakte aus Zellkulturen wurden wie unter II 11.1 beschrieben gewonnen.

14.2 Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD)

Die CAD-Aktivität wurde nach Galliano et al. (1993 a) in einem photometrischen Test gemessen. Der Testansatz enthielt 25 µl Rohextrakt, 455 µl 0.2 M Tris/HCl-Puffer (pH 8.9) und 110 µl 5 mM Coniferylalkohol (Endkonzentration 0.1 mM). Durch Zugabe von 10 µl 10 mM Nicotinamadenindinucleotidphosphat (NADP; Endkonzentration 0.4 mM) wurde die Reaktion gestartet. Der Nullabgleich am Photometer wurde ohne Enzymlösung und NADP durchgeführt. Nach Mischen des Reaktionsansatzes wurde im Photometer über 20-30 min die Zunahme der Extinktion bei 400 nm verfolgt, die auf der Bildung von Coniferylaldehyd beruht. Die Inkubationstemperatur betrug 25°C. Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität wurde mit der folgenden Formel durchgeführt:

$$\frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times 0.35 \times 10^6}{\text{Protein im Test } [\mu\text{g}]}$$

14.3 Peroxidase (POD)

Mittels einer nach Lagrimini und Rothstein (1987) veränderten Vorschrift wurde die durch enzymatische Oxidation von Guajacol hervorgerufene Zunahme der Extinktion bei 420 nm zur Aktivitätsbestimmung der Peroxidase (POD) eingesetzt. Dabei wurden 150 µl 0.02 M Guajacol (in Wasser) mit 50 µl Rohextrakt und 770 µl 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.5) versetzt und auf 30°C temperiert. Am Photometer wurde bei 420 nm ein Nullabgleich durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 0.6 M Wasserstoffperoxid gestartet und 5 min im Photometer bei 420 nm verfolgt. Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität wurde mit der folgenden Formel durchgeführt:

$$\frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times 10^3}{\text{Protein im Test } [\mu\text{g}]}$$

15. Untersuchungen zum Bindungstyp von 3,4-Dichloranilin in einem Dehydrierungspolymerisat (DHP)

15.1 Einbau von 3,4-Dichloranilin und [^{15}N]Anilin in DHPs

[U-Ring ^{14}C] 3,4-Dichloranilin (DCA; Sigma, Deisenhofen) wurde mittels präparativer HPLC vorgereinigt (HPLC-Anlage s. II. 15.3, Laufmittelgradient A). Der chemische Reinheitsgrad betrug nach der Reinigung laut UV-Detektion bei 254 nm 95 %, die radiochemische Reinheit lag laut Radiodetektor bei 99 % (Abb. 22). Für die Synthese von DHP 2 wurde das gereinigte Produkt direkt verwendet (1085401 dpm in 200 μl Methanol, Bestimmung der spezifischen Radioaktivität s.u.). Die sonstigen Substrate wurden ohne Vorreinigung verwendet.

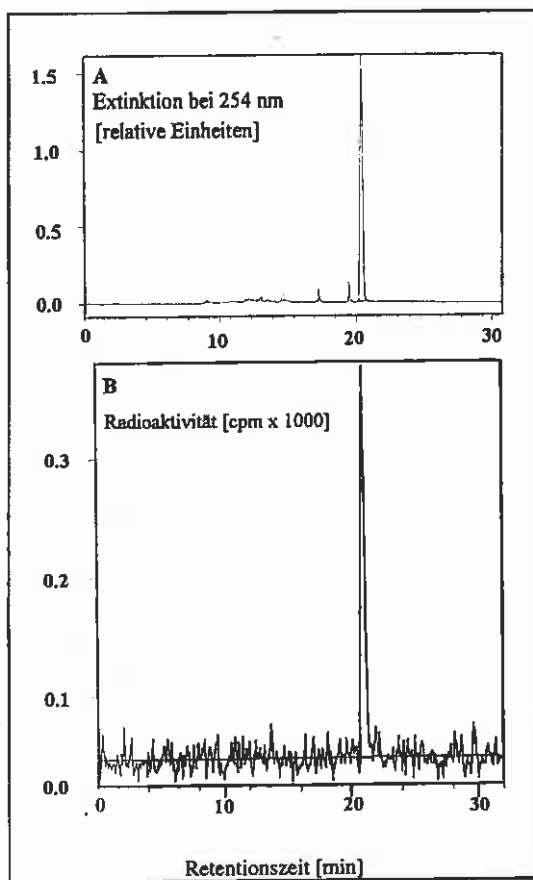


Abb. 22. HPLC-Chromatogramm des mittels präparativer HPLC gereinigten Produktes [U-Ring ^{14}C] 3,4-Dichloranilin (Amersham, Braunschweig). (A) Extinktion bei 254 nm, (B) Radiodetektion.

Sämtliche Synthesen wurden in 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.5) bei Raumtemperatur unter Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt (Versuchsanordnung s. II 13). Die Zutropfgeschwindigkeit betrug 20 ml·h⁻¹ (Zulaufverfahren), die Gesamtreaktionszeit 5 h. Die Polymerisation wurde durch käufliche Meerettich-Peroxidase (Boehringer, Mannheim) katalysiert. Die Reaktionsbedingungen bei der Synthese der Coniferylalcohol-Xenobiotika-Copolymerisate sind in Tab 9 zusammengefaßt:

Tab. 9. Reaktionsansätze für die Synthese von Coniferylalcohol-Xenobiotika-Copolymeren

DHP	Substrat 1 [mmol / x ml]	Substrat 2 [mmol / x ml]	Substrat 3 [mmol / x ml]	Enzyme [Units / x ml]
1	CA 1.11 / 75	DCA 1.11 / 75	H ₂ O ₂ 1.40 / 75	M-POD 550 / 75
2	CA 0.2 / 10	[U-Ring ¹⁴ C] DCA (1083402 dpm); DCA 0.2 / 10	H ₂ O ₂ 0.3 / 10	M-POD 150 / 20
3	CA 0.55 / 75	[¹⁵ N]Anilin 0.55 / 75	H ₂ O ₂ 1.40 / 75	M-POD 300 / 75

Abkürzungen: CA, Coniferylalcohol; DCA, 3,4-Dichloranilin; M-POD, Meerettich-Peroxidase (Boehringer, Mannheim).

Demnach wurden z.B. in DHP 1 äquimolare Mengen Coniferylalcohol (Substrat 1) und DCA (Substrat 2; jeweils 1.11 mmol in 75 ml Puffer), sowie mit 1.40 mmol Wasserstoffperoxid (Substrat 3; in 75 ml Puffer) zu 75 ml Puffer mit 550 U Peroxidase (Enzymlösung) zutropft. In einem analogen Versuchsansatz (DHP 3) wurde [¹⁵N] Anilin anstelle von DCA verwendet. Für DHP 2 wurden 0.2 mmol Coniferylalcohol (in 10 ml Puffer), eine Mischung von DCA (0.2 mmol in 10 ml Puffer) und [U-Ring¹⁴C] DCA (1083402 dpm), sowie 0.3 mmol Wasserstoffperoxid (in 10 ml Puffer) zu 150 U Peroxidase in 20 ml Puffer zutropft. Die Polymere wurden nach Abschluß der Synthese mit jeweils 20 ml 1% (w/v) SDS, 1 M NaCl und bidest. Wasser (dreimal) gewaschen, indem für 10 min inkubiert und anschließend für 25 min bei 15000 x g zentrifugiert (Zentrifuge J2-21, Beckman, Rotor JA 14, Beckman, München) wurde.

Die Radioaktivität der während der Reinigung von DHP 2 erhaltenen Fraktionen wurde im Szintillationszähler quantifiziert. Dazu wurde ein Aliquot der jeweiligen Reinigungsphase in ein mit 5 ml Hydroluma (Baker, Deventer, Niederlande) befülltes Szintillationsgefäß überführt und im Szintillationszähler (Minibeta 1211, LKB, Bromma, Schweden) die Radioaktivität gemessen (vom Gerät angegeben als detektierte Lichtblitze pro Minute, cpm). Das nach der Reinigung erhaltene Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und 24 h gefriergetrocknet (LYCOVAC GT 2, Leybold-Heraeus, Köln). Dieser Rückstand wurde in 200 µl Dimethylformamid aufgenommen, 4 µl davon wurden in ein Szintillationsgefäß überführt, 5 ml Toluol-Methanol-Cocktail zugegeben (759 ml Toluol, 250 ml Methanol, 5 g

2,5-Diphenyloxazol) und die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler quantifiziert. Die Standardisierung der Radioaktivität erfolgte mit ^{14}C -Toluol (Amersham, Braunschweig) als internem Standard. Dazu wurde der Probe nach der Messung im Szintillationszähler ein Volumen ^{14}C -Toluol-Standard mit bekannter Zerfallszahl pro Minute (dpm) zugesetzt. Die Radioaktivität der Probe wurde erneut gemessen. Die Zählausbeute (ZA) errechnete sich wie folgt:

$$\text{ZA [\%]} = \frac{\text{cpm (Probe + Standard)} - \text{cpm (Probe)}}{\text{dpm (Standard)}}$$

Damit ließ sich die spezifische Radioaktivität der Probe (in tatsächliche Zerfälle pro Minute, dpm) errechnen:

$$\text{dpm (Probe)} = \frac{\text{cpm (Probe)} \times 100}{\text{ZA [\%]}}$$

Die gravimetrisch bestimmte Ausbeute der Polymere betrug für DHP 1 59 %, für DHP 2 55 % und für DHP 3 63 %. Die Verteilung der Radioaktivität auf die unterschiedlichen Fraktionen bei der Reinigung von DHP 2 ist in Tab. 10 angegeben.

Tab. 10. Verteilung der Radioaktivität in den Reinigungsfraktionen von DHP 2.

Fraktion	Radioaktivität des analysierten Aliquots [dpm]	Gesamtradioaktivität der Fraktion [dpm]
[U-Ring- ^{14}C] 3,4-Dichloranilin nach Reinigung	21708 (4 µl von 200 µl)	1085401
Überstand nach DHP-Synthese	8078 (1 ml von 50 ml)	403900
1 % (w/v) SDS-Fraktion	11899 (1 ml von 20 ml)	237980
1 M NaCl-Fraktion	1071 (1 ml von 20 ml)	21414
1. H ₂ O-Fraktion	1057 (2 ml von 20 ml)	10568
2. H ₂ O-Fraktion	1347 (5 ml von 20 ml)	5387
3. H ₂ O-Fraktion	1254 (20 ml von 20 ml)	1254
Summe der Radioaktivität in den Reinigungsfraktionen	—	680503
Rückstand der Reinigung nach Gefriertrocknung (DHP 2)	4627 (4 µl von 200 µl)	231371
Einbaurate von 3,4-Dichloranilin in DHP 2 (unter Berücksichtigung einer Ausbeute an Polymer von 55 %)	—	40 %
Wiederfindungsrate (gesamt)	—	84 %

Für DHP 2 wurden [^{14}C] DCA und Coniferylalkohol in einem äquimolaren Verhältnis angeboten. In sämtlichen nach der Synthese erhaltenen Reinigungsfraktionen und dem Polymer wurden insgesamt 84 % der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden (Tab. 10). Der Überstand bei den nach jedem Reinigungsschritt durchgeführten Zentrifugationen enthielt geringe Mengen des Polymers, die in einem zweiten Zentrifugationsschritt (2 h bei $15000 \times g$) sedimentiert werden konnten. Die Summe der aus diesen Pellets bestimmten Radioaktivität betrug 29941 dpm. Damit erhöhte sich die Gesamt-Wiederfindungsrate der Radioaktivität auf 87 %. Unter Berücksichtigung der Ausbeute an Polymer (85 %) wurden von der Radioaktivität aus DCA 40 % im Polymer und 60 % in den Reinigungsfraktionen detektiert. Die Einbaurate von DCA in DHP 2 betrug demnach 40 %. Daraus resultiert ein molares Verhältnis von Coniferylalkohol/DCA im Polymer von 2.5 : 1.

15.2 Synthese von Modellsubstanzen

15.2.1 Reinigung von 1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1,3-diol (trivial: Guajacylglycerol- β -guajacylether)

Die Dilignol-Modellsubstanz Guajacylglycerol- β -guajacylether wurde von W. Schäfer (1986) synthetisiert. Für das Reaktionsprodukt wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ein Reinheitsgrad von 73 % ermittelt. Eine weitere Aufreinigung mittels präparativer HPLC wie unter II 15.3 beschrieben ergab eine Reinheit von 96 % (Abb. 23; Quantifizierung mittels HPLC s. II 15.4.1, Detektion bei 280 nm). Die Identität des gereinigten Produktes wurde mittels UV-, FT-IR- und NMR-Spektroskopie überprüft (s. III 4.2.1).

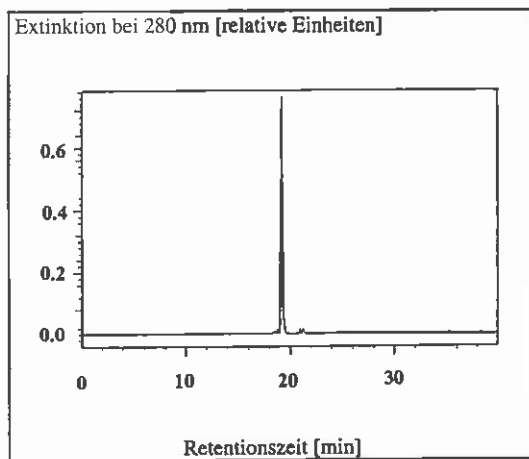
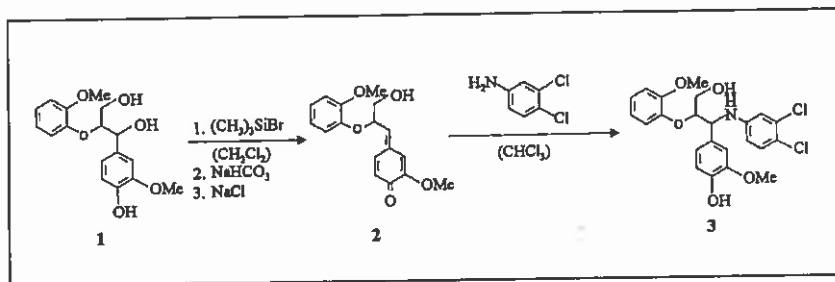


Abb. 23. HPLC-Chromatogramm des gereinigten Syntheseproduktes Guajacylglycerol- β -guajacylether (Extinktion bei 280 nm).

15.2.2 Synthese von 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dichlorphenylamino)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1-ol

(verändert nach Brunow et al. 1989)

Schema



Die Synthese der Modellverbindung gelang in zwei Stufen. Zunächst wurde die Hydroxylgruppe an C-α von Guajacylglycerol-β-guajacylether (1) gegen Brom ausgetauscht. Bei der anschließenden Hydrolyse wurde das Brom eliminiert, wobei sich eine chinoide Struktur ausbildete (2). Dann wurde der nukleophile Stickstoff des 3,4-Dichloranilins an die olefinische Doppelbindung addiert (3). Das Reaktionsprodukt bestand aus einem Gemisch von Stereoisomeren (Bezeichnungen: *threo* = DCA-Mod 1, *erythro* = DCA-Mod 2).

Ansatz

Synthesestufe 1	
Guajacylglycerol-β-guajacylether	ca. 30 mg eines braunen Öls
Trimethylsilylbromid	1 mmol
Dichlormethan	20 ml
Natriumhydrogencarbonat	40 ml einer gesättigten Lösung in Wasser
Natriumchlorid	20 ml einer gesättigten Lösung in Wasser
Natriumsulfat	3 g

Synthesestufe 2	
Produkt der Synthesestufe 1	
Chloroform	40 ml
3,4-Dichloranilin	0.2 mmol

Ein 100 ml Zweihalskolben wurde mit Stickstoff (getrocknet über Kieselgel-Trockenperlen, Serva, Heidelberg) ca. 10 min gespült und dann der in 40 ml Dichlormethan gelöste Guajacylglycerol-β-guajacylether (1) zugegeben. Durch ein Septum wurden 1 mmol

Trimethylsilylbromid in zwei Portionen mittels einer 1 ml Hamilton-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) zur gerührten Lösung gegeben und die Reaktion 4 min bei Raumtemperatur stengelassen, wobei die in α -Position der aliphatischen Seitenkette befindliche Hydroxylgruppe durch Brom substituiert wurde. Anschließend wurde die organische Phase zweimal gegen eine gesättigte Natriumhydrogencarbonat- (jeweils 20 ml) und einmal gegen eine gesättigte Natriumchlorid-Lösung (20 ml) im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Dabei entstand ein Chinonmethid der Ausgangssubstanz (2). Die organische Phase nach Extraktion wurde in einen Zweihalskolben überführt und mit 3 g Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei 0°C durch Einblasen von Stickstoff verdampft. Der Rückstand wurde in Stickstoff-Atmosphäre in 20 ml Chloroform aufgenommen. In dieser Lösung wurden durch einen Tropftrichter 0.2 mmol 3,4-Dichloranilin (DCA) in 20 ml Dichlormethan während 20 min unter Rühren bei Raumtemperatur zugetropft. Anschließend wurde die Reaktion noch 2 h weitergeführt. Die Zugabe von DCA zum Chinonmethid (2) resultierte zu ca. 85 % (Quantifizierung mittels HPLC, Detektion bei 280 nm) in der Bildung eines Additionsproduktes des DCA-Stickstoffs an C- α der aliphatischen Seitenkette unter Rückbildung des aromatischen Systems im phenolischen Rest (3). Es wurde ein Stereoisomeren-Gemisch von 80:20 (*threo*/*erythro*) nach Maßgabe der Dioden-Array-Detektion bei 280 nm erhalten (Zuordnung *threo* und *erythro* nach NMR-Spektroskopie (s. III 4.2.1)). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft (Rotationsverdampfer, Büchi, Flawil, Schweiz) und das Reaktionsprodukt mittels präparativer HPLC (siehe II 15.3, Laufmittelgradient A) gereinigt. Das Reaktionsprodukt, von dem ein gelb/brauner Lack erhalten wurde, hatte anschließend einen Reinheitsgrad von 95 % (Abb. 24; Quantifizierung mittels HPLC s. II 15.4.1, Detektion bei 280 nm). Die Identität des Produktes wurde mittels UV-, FT-IR- und NMR-Spektroskopie überprüft (s. III 4.2.1).

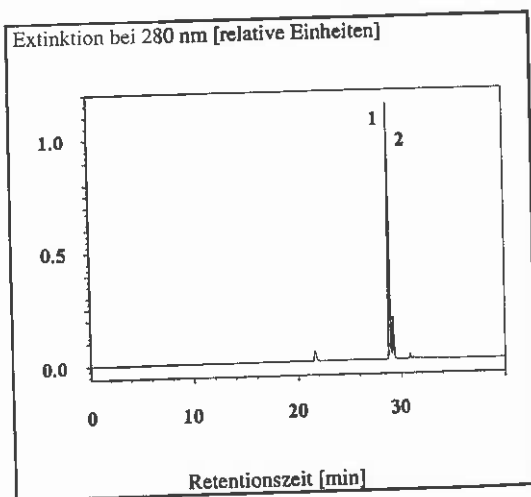
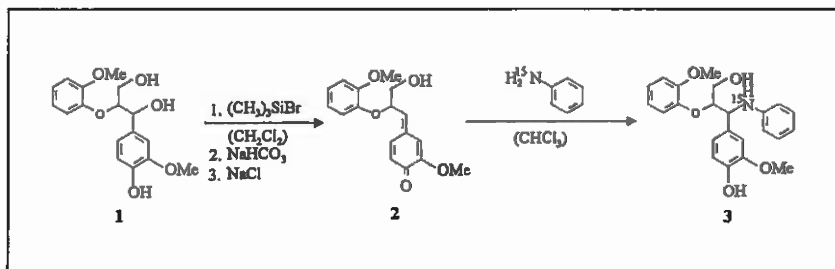


Abb. 24. HPLC-Chromatogramm der gereinigten Modellsubstanz DCA-Mod 1 (1 *threo*-Isomer, 2 *erythro*-Isomer; Extinktion bei 280 nm).

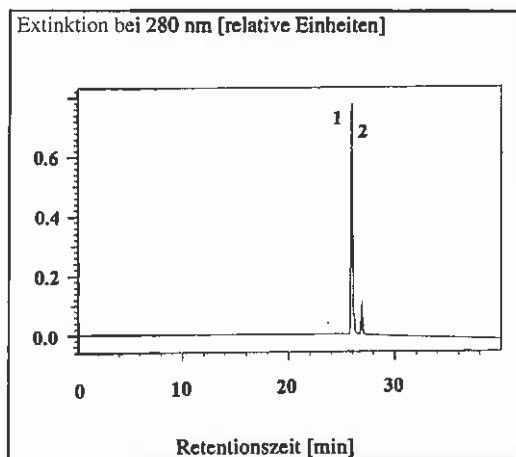
15.2.3 Synthese von [^{15}N] 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylamino-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1-ol

Schema



Die Synthese dieser Modellschubstanz wurde unter identischen Bedingungen, wie unter II 15.2.2 für DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2 beschrieben, durchgeführt. Der einzige Unterschied lag in der Verwendung von 0.2 mmol ^{15}N -Anilin statt 0.2 mmol 3,4-Dichloranilin als Reagens. Die Ausbeute lag bei ca. 80 % (Quantifizierung mittels HPLC, Detektion bei 280 nm; s. II 15.4.1). Nach Reinigung mittels präparative HPLC wurde ein gelb/brauner Lack mit einer Reinheit von 98 % (Quantifizierung mittels HPLC, Detektion bei 280 nm; Abb. 25) erhalten. Die Identität des Produktes wurde mittels UV-, FT-IR- und NMR-Spektroskopie überprüft (s. III 4.2.1). Es wurde ein *threo*/*erythro*-Isomerengemisch im Verhältnis 80:20 erhalten. Als Bezeichnungen werden Ani-Mod 1 (*threo*-Isomer) und Ani-Mod 2 (*erythro*-Isomer) verwendet.

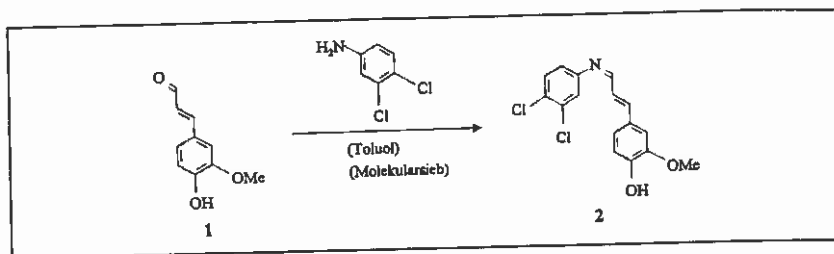
Abb. 25. HPLC-Chromatogramm der gereinigten Modellschubstanz Ani-Mod 1 (1 *threo*-Isomer, 2 *erythro*-Isomer; Extinktion bei 280 nm).



15.2.4 Synthese von N-(3,4-Dichlorphenyl)-N-iminoprop-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-en

(verändert nach Organikum (1986))

Schema

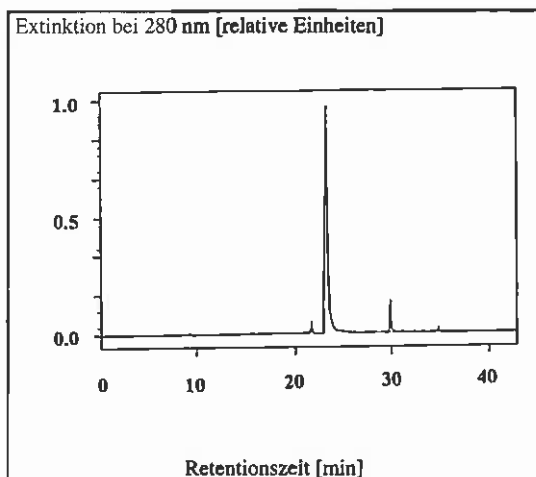


Ansatz

Coniferylaldehyd	1 mmol
3,4-Dichloranilin	2 mmol
Toluol	40 ml
Molekularsieb 3 A	2 g

In einem 100 ml Rundkolben wurden 1 mmol Coniferylaldehyd (1), und 2 mmol 3,4-Dichloranilin (DCA) in 40 ml Toluol gelöst und dann 1 g trockenes Molekularsieb (getrocknet durch Erhitzen auf 120°C für 20 h) zugegeben. Die gerührte Suspension wurde für 24 h am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Molekularsieb durch Filtration über Watte, die in den Auslauf eines Glasstrichters gefüllt war, von der Reaktionslösung getrennt, das Lösungsmittel im Vakuum verdampft (Rotavapor, Büchi, Flawil, Schweiz) und der Rückstand in 500 µl Acetonitril aufgenommen. Die Ausbeute der Modellschubstanz (2; Bezeichnung mit DCA-Mod 3) betrug nach Maßgabe einer Quantifizierung mittels HPLC (Detektion bei 280 nm) ca. 70 %. DCA-Mod 2 wurde mittels präparativer HPLC (s. II 15.3) gereinigt. Die Reinheit betrug anschließend 94 % (Quantifizierung mittels HPLC, Detektion bei 280 nm; Abb. 26). Die Identität des Produktes wurde mittels UV-, FT-IR- und NMR-Spektroskopie überprüft (s. III 4.2.1).

Abb. 26. HPLC-Chromatogramm des gereinigten Syntheseproduktes DCA-Mod 3 (Extinktion bei 280 nm).



15.3 Reinigung der Syntheseprodukte mittels präparativer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Anlage

Die zur Reinigung der Syntheseprodukte verwendete HPLC-Anlage ist identisch mit der unter II 10.6 für die HPSEC beschriebenen Gerätekonfiguration.

HPLC-Säule

Säule	Hersteller
Nucleosil C-18, Katalognummer 441 265 2510	Knauer, Berlin, Deutschland

HPLC-Laufmittel

C	bidest. Wasser filtriert über Membranfilter HVLP 04700, Millipore, Eschborn, Deutschland
D	Acetonitril filtriert über Membranfilter HVHP 04700, Millipore, Eschborn, Deutschland

Die Elution der Syntheseprodukte wurde mit einer Flußrate von $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ bei 23°C erreicht. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors zwischen 200 und 450 nm.

Laufmittel-Gradient

Die Syntheserohprodukte (gelöst in Acetonitril) wurden in Aliquoten von 10-50 µl auf die Probenschleife der HPLC injiziert und unter Benutzung der oben erwähnten Laufmittel C und D in verschiedenen Gradientenprogrammen gereinigt (s.u.). Die eluierenden Substanzen wurden in Spitzkolben aufgefangen, zur Trockene im Vakuum eingengt und für die NMR-Spektroskopie in 1 ml d_6 -Dimethylsulfoxid gelöst.

(A) Gradientenprogramm zur Reinigung von DCA-Mod 1/2 und Ani-Mod 1/2.

Zeit [min]	Laufmittel C [%]	Laufmittel D [%]	Dauer [min]
0	50	50	5
5	0	100	20
25	0	100	15
40	50	50	5
65			Beginn nächster Lauf

(B) Gradientenprogramm zur Reinigung von DCA-Mod 3.

Zeit [min]	Laufmittel C [%]	Laufmittel D [%]	Dauer [min]
0	5	95	5
5	0	100	15
20	0	100	10
30	5	95	5
45			Beginn nächster Lauf

15.4 Charakterisierung der Syntheseprodukte**15.4.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Dioden-Array-Detektion**

Die zur Charakterisierung der gereinigten Syntheseprodukte verwendete HPLC-Anlage ist identisch mit der unter 10.6 für die HPSEC beschriebenen Gerätekonfiguration.

HPLC-Säule

Säule	Hersteller
Vydac™-Säule, Katalognummer 201 TP 54	The Separations Group, USA

HPLC-Laufmittel

C	bidest. Wasser filtriert über Membranfilter HVLP 04700, Millipore, Eschborn, Deutschland
D	Acetonitril filtriert über Membranfilter HVHP 04700, Millipore, Eschborn, Deutschland

Die Elution der Syntheseprodukte wurde mit einer Flußrate von $1.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ bei 23°C erreicht. Die Detektion eluierender Substanzen erfolgte mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors zwischen 250 und 450 nm.

Laufmittel-Gradient

Zur Auftrennung der Syntheseprodukte wurden die oben erwähnten Laufmittel C und D in einem linearen Gradientenprogramm verwendet:

Zeit [min]	Laufmittel C [%]	Laufmittel [%]	Dauer [min]
0	100	0	5
5	0	100	40
50	100	0	5
60			Beginn nächster Lauf

15.4.2 Kernresonanz-Spektroskopie**(Nuclear Magnetic Resonance; NMR)**

Sämtliche NMR-Spektren wurden von Dr. N. Hertkorn und Frau E. Schindlbeck (Institut für Ökologische Chemie, GSF, Attaching) mit einem AC-400-NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K entsprechend der Meßfrequenzen für ^1H (400.13 MHz), ^{13}C (100.62 MHz) und ^{15}N (40.62 MHz) aufgenommen.

NMR-Spektrometer

Gerät	Hersteller
AC-400	Bruker, Karlsruhe, Deutschland
Software NMR 2000	Bruker, Karlsruhe, Deutschland

Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit einem 5 mm Invers-Probenkopf, die ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Spektren mit einem 5 mm Breitbandprobenkopf registriert. Typische 90 Grad-Puls-längen betrugen für ^1H 8 μs , für ^{13}C 7.5 μs und für ^{15}N 13.5 μs . Die chemische Verschiebung für ^1H wurde auf den entsprechenden Wert des Restsignals von CHD_2OD in d_4 -Methanol (3.30 ppm) bzw. d_6 -Dimethylsulfoxid (2.49 ppm), jene für ^{13}C auf den Wert von

CD₃OD (49.0 ppm) bzw. d₆-Dimethylsulfoxid (39.5 ppm) bezogen. Als externer Standard bei der ¹⁵N-NMR-Spektroskopie diente [¹⁵N] Nitromethan in d₆-Aceton (0.00 ppm). INEPT-Spektren wurden wegen der günstigeren Unterdrückung der Antiphasen-Komponenten in der refokussierten Form mit einem 90 Grad-(¹H)-Purge-Puls am Ende des t₂-Delays aufgenommen. Zur Vermeidung von SPT-Effekten wurden NOE-Spektren mit 90 Grad-Pulsen detektiert. Zweidimensionale NMR-Spektren wurden mit der Standardsoftware (NMR 2000) der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen. H,H-COSY-Spektren wurden mit 1 k Datenpunkten in F 2 mit 256 Inkrementen, phasensensitive COSY-Spektren mit 2 k Datenpunkten entsprechend einer digitalen Auflösung von ca. 1.5 Hz in F 2 mit bis zu 1024 Inkrementen registriert. C,H- und N,H-Korrelationsspektren wurden mit 4 k Datenpunkten in F 2 mit bis zu 256 Inkrementen aufgenommen. Für C,H-COLOC-Spektren wurde eine ¹J (C-H)-Kopplungskonstante von 7.5 Hz, für N,H-COLOC-Spektren eine ¹J (N-H)-Kopplungskonstante von 4 Hz angenommen. Zur Beschreibung der Kopplungsmuster fanden die folgenden Abkürzungen Verwendung:

Abkürzung	s	d	t	q	m
Bedeutung	Singulett	Dublett	Triplett	Quartett	Multiplett

15.4.3 Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)

Die Geräteangaben stimmen mit den unter II 10.2 genannten Daten exakt überein. Die Spektren wurden von konzentrierten Lösungen der Substanzen in Dimethylsulfoxid, von denen einige Tropfen zwischen flache Natriumchlorid-Platten gepreßt wurden, aufgenommen. Die Spektren wurden im Wellenzahlenbereich zwischen 670 und 4000 cm⁻¹ registriert.

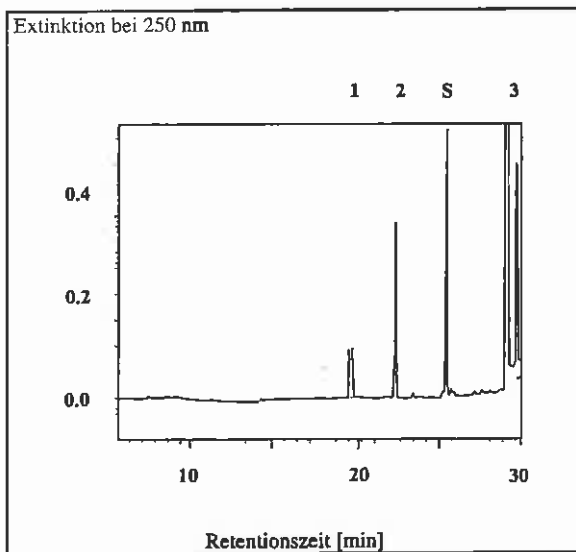
16. Hydrolysekinetik und pH-Stabilität der Bindungen von Anilinen in DHPs und Modellschubstanzen

Zu den Proben (unter II 15.1 und II 15.2 beschriebene Modellverbindungen und Dehydrierungspolymerisate) wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 0.01 mM 2,4-Dichloranilin (interner Standard) gegeben und in 100 µl 0.1 M HCl bei 37°C im Wasserbad (Plexiglasbad 4P und Thermostat MT/2, Haake, Karlsruhe) für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Anschliessend wurde durch Beimischung von 110 µl 0.1 M NaOH ein leicht basischer pH-Wert (ungefähr pH 8) eingestellt und die Lösung gegen 200 µl Ethylacetat extrahiert. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (2 min Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen) beschleunigt, 100 µl von der organischen Phase wurden abgenommen, das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand in 40 µl Acetonitril/Wasser (4:1;

v/v) aufgenommen. Der Verlauf der Hydrolyse wurde mittels HPLC (Bedingungen siehe II 15.4.1) quantifiziert (Abb. 27).

Abb. 27. HPLC eines Extraktes einer milden sauren Hydrolyse (0.1 M HCl, 37°C) einer Modellsubstanz für den Bindungstyp von DCA in DHPs (Stereoisomeren-Gemisch DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2). (Quantifizierung mittels HPLC). Peaknummern:

1 Guajacylglycerol- β -guajacylether (Produkt 1 der Hydrolyse);
2 DCA (Produkt 2 der Hydrolyse);
3 Stereoisomeren-Gemisch DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2;
S 2,4-Dichloranilin (interner Standard).



Zur Bestimmung der pH-Stabilität wurden 0.1 M Lösungen von Kaliumphosphatpuffer (Dawson et al. 1989) für pH-Werte von 1-12 angesetzt. Die Proben wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 μ l Phosphatpuffer versetzt und bei Raumtemperatur für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Die Proben wurden ohne vorherige Neutralisation gegen 200 μ l Ethylacetat extrahiert. Zur weiteren Aufbereitung wurde wie o.a. verfahren.

Zur Hydrolyse des Coniferylalkohol / [14 C] 3,4-Dichloranilin-Copolymers wurden 4 μ l der Polymerlösung (in Dimethylformamid, jeweils ca. 4000 dpm) in Eppendorf-Reaktionsgefäße, die mit 200 μ l 0.1 M HCl befüllt waren, überführt und bei 37°C im Wasserbad (Haake, Karlsruhe) inkubiert. Die Probe wurde nach der entsprechenden Hydrolysezeit direkt zentrifugiert (2 min Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen), der gesamte Überstand in ein mit 5 ml Hydroluma (Baker, Deventer, Niederlande) befülltes Szintillationsgefäß überführt und im Szintillationszähler (Minibeta 1211, LKB, Bromma, Schweden) die Radioaktivität gemessen (s. II 15.1). Der Rückstand wurde in 200 μ l Dimethylformamid aufgenommen, in ein Szintillationsgefäß überführt, 5 ml Toluol-Methanol-Cocktail zugegeben (759 ml Toluol, 250 ml Methanol, 5 g 2,5-Diphenyloxazol) und die Radioaktivität im Szintillationszähler quantifiziert.

III. ERGEBNISSE

1. Induktion der Ligninbildung in Fichten-Suspensionskulturen mit einem *Rhizosphaera kalkhoffii*-Elicitor

1.1 Ligninbildung in Zellwänden und im Kulturmedium

Fichten-Suspensionskulturen (3.5 g Feuchtgewicht in 35 ml Medium) wurden drei Tage nach dem Animpfen mit 1 ml (entsprechend 0.1 mg Glucoseäquivalente pro ml Kulturmedium) einer Elicitorsuspension des Fichtennadel-Pathogens *Rhizosphaera kalkhoffii* inkubiert. Schon zwei Tage nach Elicitorzugabe war eine Trübung des Kulturmediums zu beobachten, die auf die Akkumulation eines Polymers zurückzuführen war (Abb. 28).

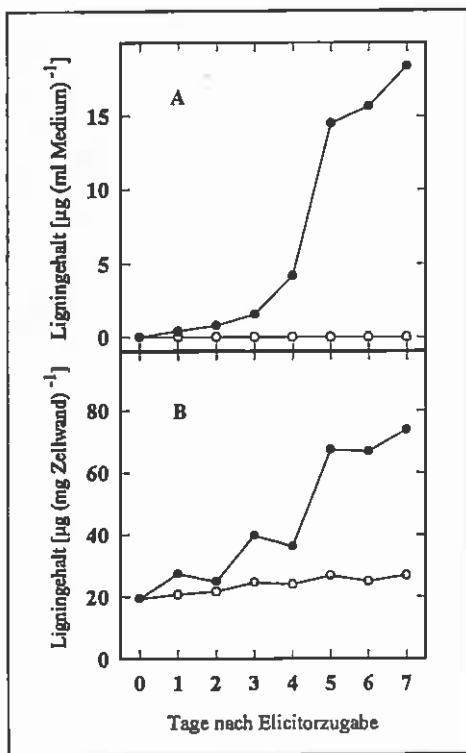


Abb. 28. Trübung des Kulturmediums von Fichten-Suspensionskulturen fünf Tage nach Zugabe eines *Rhizosphaera kalkhoffii*-Elicitors (Details siehe Text).
Links: Kontrollkultur.
Rechts: Elicitor-induzierte Kultur.

Das Kulturmedium wurde durch Filtration über Nylon-Gewebe von den Zellen getrennt und zentrifugiert (30 min bei 25900 x g). Das extrazelluläre Polymer bildete einen Niederschlag, von dem der Überstand abdekantiert wurde. Der Rückstand wurde mit 1 % (w/v) SDS, 1 M NaCl und zweimal mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Nach sieben Tagen wurden pro Kulturkolben ca. 1.8-2.5 mg dieses Rückstandes (extrazelluläres Polymer) erhalten. Eine Farbreaktion mit dem Phloroglucinol/HCL-Reagens führte zur Ausbildung eines tiefroten Chromophors, der charakteristisch für ligninartige Polymere ist. Die Derivatisierung des extrazellulären Polymers mit

Thioglycolsäure und die anschließende spektrophotometrische Erfassung der gebildeten Lignin-Thioglycolsäure-Derivate (LTGA-Methode) bei 280 nm wiesen ebenfalls auf das Vorkommen von Lignin-Komponenten hin. Eine Färbereaktion mit dem Sudanschwarz B-Reagens zur Anfärbung von suberinartigen Polymeren mit einem hohen Anteil an Hydroxyfettsäureestern verlief negativ. Die Kinetik der Bildung von ligninartigem Material in der Zellwand und im Medium der Fichten-Suspensionskulturen wurde mit Hilfe der LTGA-Methode verfolgt (Abb. 29). Verschiedene Mengen eines Dehydrierungspolymerisates, welches ausschließlich Coniferylalkohol als monomeren Baustein enthielt, wurden nach dieser Methode behandelt und aus den Extinktionswerten der gebildeten Thioglycolsäure-Derivate (LTGA) bei 280 nm eine Eichkurve erstellt, zu der die Extinktion der LTGA des Zellkulturlignins in Beziehung gesetzt wurde (s. II 9.1).

Abb. 29. Akkumulation von ligninartigem Material im Medium (A) und in Zellwänden (B) von Fichten-Suspensionskulturen nach Maßgabe der LTGA-Methode (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten; Details siehe Text).
Symbole: -○- Kontrollkulturen.
-●- Elicitor-behandelte Kulturen.



Im Medium wurde schon einen Tag nach Zugabe des Elicitors Lignin nachgewiesen ($0.4 \mu\text{g}$ Lignin pro ml Kulturmedium). Bis zum dritten Tag nach Elicitierung wurde ein schwacher Anstieg, dann ein etwas stärkerer Zuwachs bis zum fünften Tag und schließlich eine langsamere Zunahme von ligninartigem Material bis zum Ende des Experiments ge-

messen (18 µg pro ml Medium). Nach Maßgabe der LTGA-Methode enthielt das extrazelluläre Polymer fünf Tage nach Elicitierung 35 % (w/w) Lignin. Das Medium von Kontrollkulturen, die mit dem gleichen Volumen bidest. Wasser statt Elicitorsuspension behandelt waren, enthielt kein Lignin. Die Zellwände der Suspensionszellen enthielten konstitutiv ligninartiges Material auch in den Kontrollkulturen (19 µg Lignin pro mg Zellwandmaterial). Nach Elicitor-Zugabe stieg der Ligningehalt annähernd linear auf 74 µg pro mg Zellwand gegen Ende des Experiments an. Im gesamten Kulturkolben wurde sieben Tage nach Elicitor-Zugabe im Medium ein Ligningehalt von ca. 600-700 µg, in den Zellen ein Gehalt von ca. 25-43 mg Lignin ermittelt. Demnach war der Ligningehalt pro Kulturkolben in Zellwänden ca. 40-60-fach höher als im Kulturmedium. Eine detaillierte strukturelle Charakterisierung wurde ausschließlich mit dem extrazellulären Polymer durchgeführt, da ein Vergleich mit Ligninen der frühen Entwicklungsstadien gezogen werden sollte und das einzige bisher gut charakterisierte *de novo*-Lignin im Medium einer Fichten-Suspensionskultur akkumulierte (Brunow et al. 1993).

1.2 Charakterisierung des extrazellulären Polymers

1.2.1 Löslichkeit

Die Löslichkeit des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL) wurde mit Hilfe der LTGA-Methode bestimmt. Dazu wurde das durch mehrere Extraktionsschritte gereinigte Polymer (ca. 20 mg) zum entsprechenden Lösungsmittel (5 ml) in einem verschraubbaren 10 ml Reagenzglas (Pyrex, Bender und Hobein, München) gegeben, für 10 min unter Eis-kühlung mit Ultraschall behandelt (Ultraschallstab Branson B-12, Bachofer, Reutlingen) und weitere 24 h unter Rühren bei 23°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 10 ml Reagenzglas überführt und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert (Swing out-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand und der Rückstand nach Zentrifugation wurden getrennt der Thioglycolsäure-Derivatisierung unterzogen (s. II 9.1) und die anschließend errechneten Ligningehalte miteinander verglichen. Die dabei erhaltenen Resultate sind in Tab. 11 wiedergegeben.

Tab. 11. Löslichkeit des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen in verschiedenen Solventien. Messung mit Hilfe der LTGA-Methode (Details siehe Text).

Solvens	DMF	DMSO	Dioxan	THF	CHCl ₃	0.1 M NaOH
Ligningehalt lösliche Fraktion [µg pro mg Polymer]	90	78	60	9-13	7-9	71
Ligningehalt unlösliche Fraktion [µg pro mg Polymer]	257	260	299	315	324	284
Löslichkeit	26 %	23 %	17 %	< 5 %	< 5 %	20 %

1.2.2 Thioacidolyse und Desulfurierung

Die Thioacidolyse ist eine Solvolyse in Dioxan/Ethanthiol und Bortrifluorid, die zur Depolymerisierung von Lignin führt und eine Analyse der Bindungstypen im Ursprungspolymer ermöglicht (Lapierre et al. 1986; Lapierre et al. 1991). Die Reaktionsmischung nach Thioacidolyse von Lignin enthält im allgemeinen einen erheblichen Teil monomerer und dimerer Abbauprodukte (ca. 1.4 mmol pro Gramm Lignin aus Fichtenholz). Diese Reaktionsprodukte werden nach Derivatisierung mittels GC-MS untersucht.

Analyse der Monomierzusammensetzung

Die Ausbeute an monomeren Reaktionsprodukten nach Thioacidolyse spiegelt den Anteil von Lignin-Teilstrukturen, die mittels B-O-4-Bindungen verknüpft sind, wieder (Abb. 30). Das Hauptprodukt unter den Monomeren ist das Guaiacyl-Monomer **1**, dessen Existenz auf den Einbau von Coniferylalkohol als Monolignol zurückzuführen ist. Verbindung **2** entsteht auf einem Nebenweg der Reaktion zu **1**. Produkt **3** wird aus *p*-Hydroxyphenyl-Einheiten gebildet, die von *p*-Cumarylalkohol als Ligninvorstufe stammen. Coniferylaldehyd-Endgruppen führen zum Produkt **4**, während Coniferylalkohol-Endgruppen die Produkte **5** + **6** ergeben.

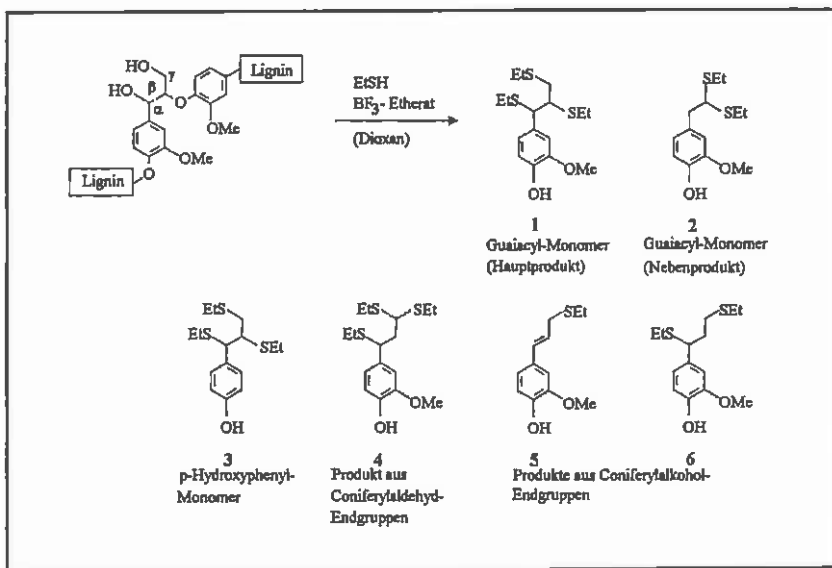


Abb. 30. Monomere Reaktionsprodukte nach Thioacidolyse.

Die Ergebnisse der Thioacidolyse von extrazellulärem Zellkulturlignin (ECL), das nach verschiedenen Inkubationszeiten mit dem *Rhizosphaera kalkhoffii*-Elicitor geerntet wurde (ECL 3, 5 und 6; Ernte 3, 5 bzw. 6 Tage nach Elicitorzugabe), Holzlignin von Fichte (*Picea sitchensis*; SWL) und einem Dehydrierungspolymerisat, das durch *in vitro*-Synthese von Lignin aus Coniferylalkohol und *p*-Cumarylalkohol (DHP 5, s. II 13.) hergestellt wurde, sind in Tab. 12 zusammengefaßt. Die Menge an Guajacyl-Hauptprodukt 1 nach Thioacidolyse war in den Zellkultur-Ligninen (291-511 μmol pro Gramm Lignin; Quantifizierung unter Berücksichtigung des Ligningehaltes von 35 % (w/w) am Polymer-Trockengewicht) deutlich niedriger als im Holzlignin (950 μmol pro Gramm) oder dem Dehydrierungspolymerisat (DHP; 630 μmol pro Gramm). Der Anteil chemisch leicht spaltbarer 8-O-4-Bindungen war demnach in ECL und DHP relativ gering. Die Ausbeute des aus *p*-Hydroxyphenyl-Einheiten gebildeten Monomers 3 (54-89 μmol pro Gramm; entsprechend 19-20 % des Guajacyl-Monomers 1) lag weit über der bei Holzlignin (1 %) und entsprach etwa jener bei Kompressionsholz (20 %; Lapiere und Rolando 1988). Der relative Anteil an Coniferylalkohol-Endgruppen (5, 6) war in den ECL-Proben deutlich höher (16-21 % vom Guajacyl-Monomer 1) als in SWL (7 %), allerdings niedriger als in DHP (36 %). Der Anteil von Coniferylaldehyd-Endgruppen (4) lag bei ECL (4-6 % von 1) in der gleichen Größenordnung wie bei SWL (4 %), während diesem Strukturmerkmal in DHP (8 %) eine etwas größere Bedeutung zukam. Die Gesamtausbeute an monomeren Thioacidolyseprodukten aus ECL wurde zu späteren Erntezeitpunkten hin größer.

Tab. 12. Analyse der monomeren Thioacidolyseprodukte von Zellkulturlignin (ECL 3,5 und 6; Ernte 3, 5 und 6 Tage nach Elicitorzugabe) und Vergleich mit Lignin aus Fichtenholz (SWL), sowie einem Dehydrierungspolymerisat (DHP 5; s. II. 13). Quantifizierung der Produkte in μmol pro Gramm Lignin unter Berücksichtigung des Ligningehaltes (35 % (w/w) für ECL, 28 % für SWL, 100 % für DHP; s. III 1.1).

Verbindung	ECL 3 [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]	ECL 5 [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]	ECL 6 [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]	SWL [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]	DHP [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]
1	291 (100 %)	451 (100 %)	511 (100 %)	950 (100 %)	630 (100 %)
2	17 (6 %)	26 (6 %)	31 (7 %)	50 (5 %)	38 (6 %)
3	54 (19 %)	86 (19 %)	89 (20 %)	9 (1 %)	105 (17 %)
4	11 (4 %)	29 (6 %)	26 (6 %)	39 (4 %)	50 (8 %)
5, 6	49 (16 %)	77 (17 %)	94 (21 %)	68 (7 %)	226 (36 %)
Gesamtausbeute	422	669	751	1116	1049
Relative Mol % Dimere	31.5	32.3	33.3	25	35

Quervernetzung der Ligninbausteine

Die Quantifizierung der durch das Thioacidolyse-Reagens nicht gespaltenen C-C- und Diarylether-Bindungen, der sogenannten kondensierten Bindungen, wurde durch eine Desulfurierung mit Raney-Nickel, bei der die Thioethylgruppen der aliphatischen Seitenkette durch Wasserstoff ersetzt werden, ermöglicht. Die Strukturen der wichtigsten dimeren Abbauprodukte und die zugrundeliegenden Bindungstypen im Polymer sind in Abb. 31 gezeigt.

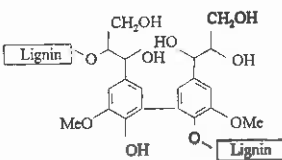
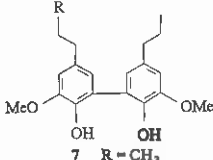
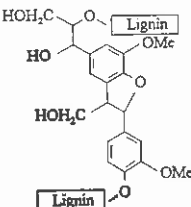
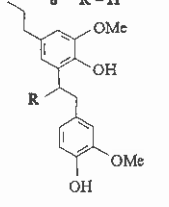
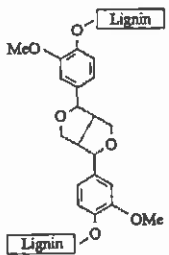
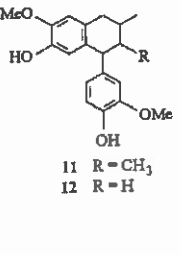
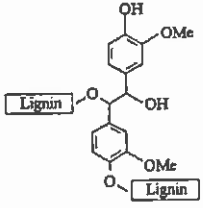
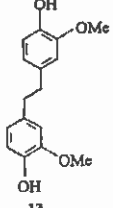
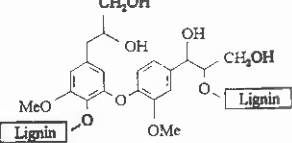
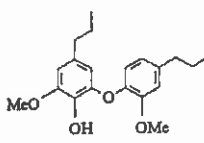
Bindungstyp	Strukturmerkmal	Dimere Thioacidolyseprodukte nach Desulfurierung
5-5		
B-5		
B-β		
B-1		
4-O-5		

Abb.31. Dimere Reaktionsprodukte aus Guajacyl-Guajacyl (G-G)-Struktureinheiten nach Thioacidolyse und Raney-Nickel-Desulfurierung.

Die Gesamtausbeute der fünf mengenmäßig bedeutsamsten dimeren Reaktionsprodukte von ECL betrug 32-33 % von jener des monomeren Guajacyl-Hauptproduktes 1, bei DHP wurden 35 %, bei SWL 25 % ermittelt (Tab. 13). Im Vergleich mit SWL wurde in den ECL-Proben ein deutlich höherer Gehalt an Dimeren, die aus Pinoresinol-Einheiten gebildet wurden, festgestellt (23-24 % gegenüber Spuren). Die Ausbeute von Abbauprodukten aus β -1-Struktureinheiten lag für ECL dagegen merklich unter dem Wert für SWL (9-10 % gegenüber 28 %). Ähnliche Ergebnisse wurden mit DHP erhalten (22 % β - β ; 6 % β -1). Produkte aus β -5-, 5-5- und 4-O-5-Bindungen lagen bei ECL und SWL in einer ähnlichen Größenordnung, während DHP im Verhältnis weniger Produkte aus 5-5- und mehr aus β -5-Bindungen aufwies. Neben diesen Abbauprodukten wurden in ECL geringe Mengen unsymmetrischer *p*-Hydroxyphenyl-Guajacyl (H-G)-Dimere nachgewiesen (8 % der G-G-Dimere). Darunter hatten die Produkte aus 5-5- und β - β -Einheiten die größte Bedeutung.

Tab. 13. Analyse der dimeren Produkte nach Thioacidolyse und Desulfurierung von Zellkulturlignin (ECL 3, 5 und 6; Ernte 3, 5 und 6 Tage nach Elicitorzugabe) und Vergleich mit Lignin aus Fichtenholz (SWL) sowie einem Dehydrierungspolymerisat (DHP 5; s. II. 13). Quantifizierung der Produkte in μmol pro Gramm Lignin unter Berücksichtigung des Lignin-gehaltes (35 % (w/w) für ECL, 28 % für SWL, 100 % für DHP; s. III 1.1).

Dimere Bindungstyp	7 + 8 5-5	9 + 10 β -5	11 + 12 β - β	13 β -1	14 4-O-5
Ausbeute der G-G-Dimere [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]					
ECL 3	23.7	39.4	24.9	9.1	2.8
ECL 5	37.7	54.0	33.4	14.6	6.0
ECL 6	45.1	57.7	41.4	19.4	6.6
Mol % der G-G-Dimere bezogen auf das Guajacyl-Hauptprodukt 1					
ECL	24-26	35-40	23-24	9-10	3-4
SWL	33	30	Spuren	28	6.5
DHP	19	54	20	4	3

1.2.3 ^1H -Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie

Der ^1H -NMR-Spektroskopie kommt ein großer Nutzen bei der Charakterisierung und Klassifizierung von Ligninen zu (Lundquist 1993). Dabei werden in den meisten Fällen die Ligninproben zuvor acetyliert und die NMR-Spektren in d_1 -Chloroform oder d_6 -Aceton aufgenommen. Das extrazelluläre Lignin-artige Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen zeigte weder underivatisiert noch acetyliert eine akzeptable Löslichkeit in gängigen Lösungsmitteln für die NMR-Spektroskopie (s. III 1.2.1). Nur in d_6 -Dimethylsulfoxid konnte eine für die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums ausreichende Menge des acetylierten Polymers gelöst werden (Abb. 32). Die Zuordnung der NMR-Signale zu den unterschiedlichen H-Atomen ist in Tab. 14 gezeigt.

Die Signalzuordnung der H-Atome erfolgte anhand der in Übersichtsartikeln zusammengefaßten Daten (Lundquist 1980; Lundquist und Stern 1989). Als Grundlage dieser Spektren-

kataloge dienten ausführliche Untersuchungen mit Modellsubstanzen für die unterschiedlichen in Ligninen vorkommenden Bindungstypen. Diagnostischen Wert für die Charakterisierung Lignin-artiger Polymere haben vor allem die folgenden Signale: Acetylierte aliphatische Hydroxylgruppen (Methylgruppen der Acetylreste bei 1.85-2.05 ppm), acetylierte aromatische Hydroxylgruppen (Methylgruppen der Acetylreste bei 2.15-2.30 ppm), aromatische Methoxygruppen bei 3.70-3.85 ppm und aromatische H-Atome bei 6.80-7.10 ppm. Die chemische Verschiebung sonstiger auftretender Signale liegt in Bereichen, in denen die Signale weiterer Zellwandkomponenten (Polysaccharide bei 2.70-4.80 und 5.50-6.00 ppm, H-Atome von Proteinen) auftreten und die Zuordnung erschweren. Der Informationsgehalt der ^1H -NMR-Spektren wird von jenem der ^{13}C -NMR-Spektren deutlich übertroffen. Wegen der Unempfindlichkeit und der geringen natürlichen Häufigkeit dieses Kohlenstoff-Isotops für die NMR-Spektroskopie wird allerdings eine größere Menge Probenmaterial benötigt. Die Löslichkeit von ECL in den gängigen NMR-Lösungsmitteln war zu gering, um ^{13}C -NMR-Spektren mit einer akzeptablen Intensität und Auflösung zu gewinnen.

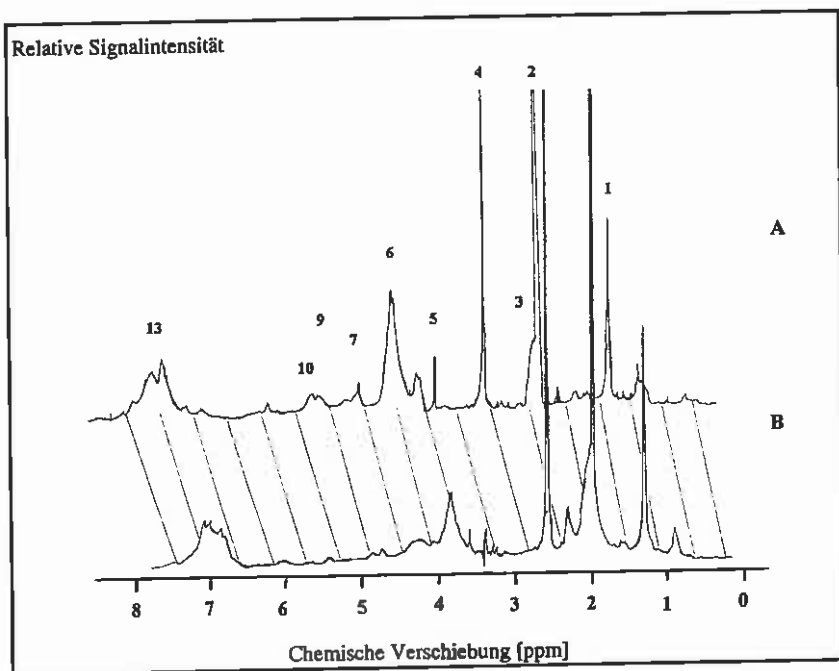


Abb. 32. ^1H -NMR-Spektren von acetylierten Proben eines extrazellulären ligninartigen Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (A) und Milled-Wood-Lignin von Fichte (B) in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K. Die Spektren sind aus Gründen der Übersichtlichkeit der Darstellung leicht versetzt abgebildet. Die Numerierung der Signale entspricht den in Tab. 14 wiedergegebenen Zuordnungen zu den unterschiedlichen H-Atomen.

Tab. 14. Zuordnung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale eines extrazellulären ligninartigen Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL 5, Ernte 5 Tage nach Elicitorzugabe) und Milled-Wood-Lignin von Fichte (MWL) in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K. Die aufgelisteten Bindungstypen sind in den Abb. 30 und 31 gezeigt.

Signalnummer	Zuordnung	δ [ppm] (Literatur)	δ [ppm] (ECL 5)	δ [ppm] (MWL)
1	Kontamination durch Kohlenwasserstoffe	1.10-1.30	-	1.23
2	Aliphatisch gebundenes Acetat	1.85-2.05	1.90	1.90
3	Aromatisch gebundenes Acetat	2.15-2.30	2.22	2.23
4	Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)	2.49	2.49	2.49
5	Methanol (interne Referenz)	3.28	3.28	3.28
6	Aromatische Methoxygruppen	3.70-3.85	3.74	3.74
7	H- γ in verschiedenen Strukturen	4.20-4.30	4.20	4.22
8	H- γ in β -O-4- und β -5-Strukturen	4.35-4.40	-	-
9	H- β in β -O-4-Strukturen	4.60-4.70	-	4.63
10	H- α in β - β -Strukturen	4.75-4.85	4.80	-
11	H- α in β -5-Strukturen	5.45-5.50	-	-
12	H- α in β -O-4 und β -1-Strukturen, H- β in Zimtalkohol-Seitenketten	6.00-6.20	-	-
13	Aromatische und Vinyl-H-Atome	6.80-7.10	6.80-6.99	6.82-7.06
14	Vinyl-H-Atome in Hydroxymethylaldehyd-Seitenketten	7.35-7.45	-	-
15	Formyl-H-Atome in Hydroxymethylaldehyd-Seitenketten	9.50-9.65	-	-

1.2.4 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Das FT-IR-Spektrum des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL) zeigte die für Lignine charakteristischen Banden, allerdings mit einer unterschiedlichen Intensitätsverteilung im Vergleich mit Milled-Wood-Lignin (MWL), welches durch Extraktion und Mahlen von Holz über einen längeren Zeitraum in einer Kugelmühle gewonnen wurde (Abb. 33).

Die beobachteten Banden, deren Intensität und Zuordnung sind in Tab. 15 aufgelistet. Nur wenige Gruppenfrequenzen konnten zweifelsfrei zugeordnet werden, wie z.B. die O-H, C-H und C=O-Valenzschwingungen oberhalb von 1600 cm^{-1} , sowie die C=C-Valenzschwingungen in Aromaten bei 1510 cm^{-1} . Der C=C-Valenzschwingung bei 1610 cm^{-1} liegt allerdings eine Überlagerung mehrerer Schwingungszustände zugrunde. Die Interpretation der Banden unter 1430 cm^{-1} ist recht kompliziert. Fast sämtliche Banden in diesem Bereich sind komplexen Ursprungs (Faix 1993). Die wesentlichen Unterschiede zwischen ECL und MWL sind im sogenannten Fingerprint-Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} zu finden.

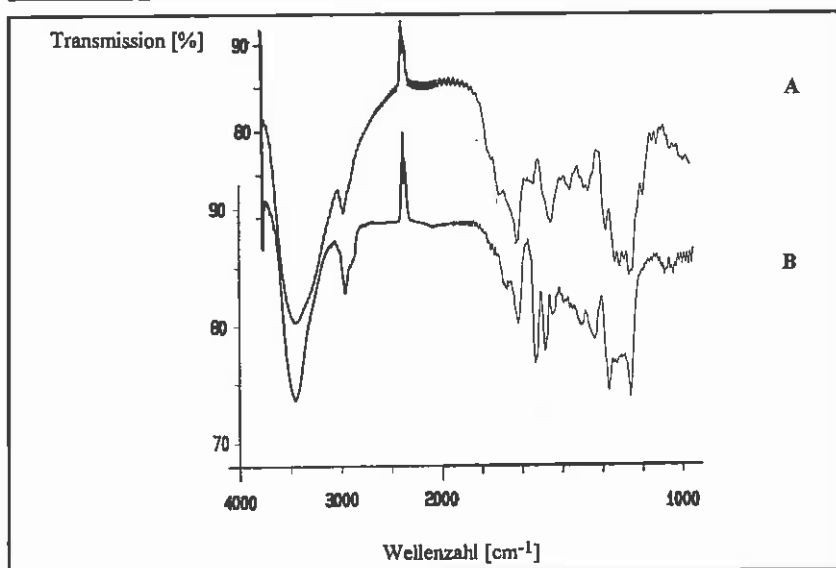


Abb. 33. FT-IR-Spektren von Zellkulturlignin (ECL 3; A) und Milled-Wood-Lignin aus Fichtenholz (MWL; B).

Tab. 15. Zuordnung der FT-IR-Banden von extrazellulärem Lignin aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL) und Milled-Wood-Lignin von Fichte (MWL).

Bande [cm ⁻¹]	Zuordnung der Bande	Maxima der Banden in ECL		Maxima der Banden in MWL	
		[cm ⁻¹]	Intensität	[cm ⁻¹]	Intensität
4312-3460	O-H-Valenzschwingung	3411	+++	3440	+++
3000-2842	C-H-Valenzschwingung in Methyl- und Methylengruppen	2931	+	2945	+
1655-1675	C=O-Valenzschwingung in konjugierten para-substituierten Carbonylen	1660	+	1662	+
1620-1635	C=C-Valenzschwingungen in konjugierten Doppelbindungen + Aromat	-	-	-	-
1593-1610 und 1505-1515	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten	1610	+++	1607	+++
1460-1470	asymmetrische C-H-Deformationsschwingungen in Methyl- und Methylengruppen	1465	+	1522	++
1420-1435	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten	1470	-	1431	++

Fortsetzung Tab. 15, Zuordnung FT-IR-Banden von ECL

Bande [cm ⁻¹]	Zuordnung der Bande	Maxima der Banden in ECL		Maxima der Banden in MWL	
		[cm ⁻¹]	Intensität	[cm ⁻¹]	Intensität
1370-1390	symmetrische C-H-Deformations-schwingungen in Methyl- und Methylengruppen	1378	+	1381	+
1325-1330	G-Ring über C-C-Bindung verknüpft	1330	+	1330	+
1266-1270	G-Ring; C=O-Valenzschwingung	1270	+	1270	+
1221-1230	C-O-, C=O-Valenzschwingungen	1230	+	1228	+
1140	aromatische C-H in plane-Deformationsschwingung; typisch für G-Einheiten	1144	++	1140	+++
1128-1125	C=O-Valenzschwingung	1130	+	-	-
1086	C-O-Deformationsschwingung in sekundären Alkoholen	1075	+++	1080	+
1030-1035	aromat. C-H in plane-Deformationsschwingung in G-Einheiten; C-O-Deformationsschwingung in prim. Alkoholen; C=O-Valenzschwingung (nicht konjugiert)	1026	+++	1030	+++
966-990	-HC=CH- out of plane-Deformationsschwingung	962	+	-	-
915-925	C-H out of plane-Deformationsschwingung (aromatisch)	915	+	-	-
853-858	C-H out of plane-Deformationsschwingung in G-Einheiten	853	+	860	+
817-832	C-H out of plane-Deformationsschwingung in G-Einheiten	828	+	825	+

1.2.5 Elementaranalyse

Die Analyse der elementaren Zusammensetzung des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL 3, 5 und 6; Ernte 3, 5 und 6 Tage nach Elicitor-Zugabe) wies im Vergleich zum Lignin aus Fichtenholz (Milled-Wood-Lignin von *Picea abies*, erhalten nach intensivem Mahlen in einer Kugelmühle (MWL)) einen recht niedrigen Kohlenstoff- (< 50 % gegenüber ca. 62 %) und einen hohen Sauerstoffgehalt (> 40 % gegenüber ca. 30 %) auf (Tab. 16). Eine vergleichbare Verteilung der Elemente wurde bei Holzspänen von Fichte (ca. 47 % C, ca. 46 % O) gefunden. Bemerkenswert hoch war der Anteil von Stickstoff in den ECL-Proben (3,5-4,0 % gegenüber 0,8 % bei MWL). Dieser Stickstoffgehalt entspräche, unter der Annahme, daß sämtlicher Stickstoff auf das Vorkommen von Aminosäuren zurückzuführen wäre, einem Proteingehalt von ca. 32 % (w/w) (laut Lehninger (1970) beträgt der Anteil von Stickstoff in Aminosäuren statistisch ca. 12 %).

Tab. 16. Elementare Zusammensetzung eines extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL 3, 5, und 6; Ernte 3, 5, und 6 Tage nach Elicitor-Zugabe), Milled Wood Lignin von Fichte (MWL) und Holzspänen von Fichte*.

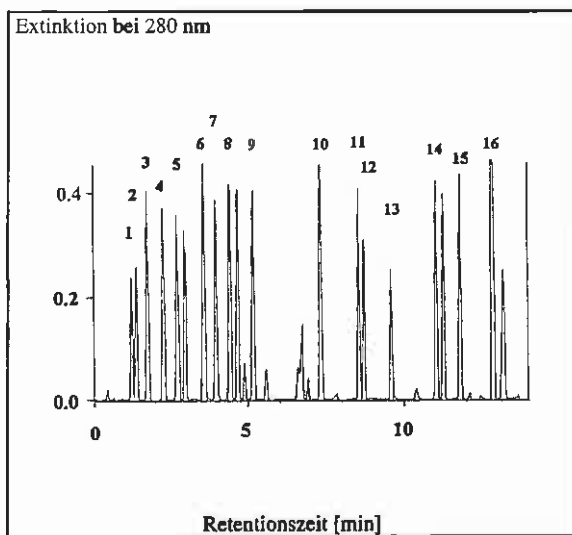
Probe	C	H	O	N
ECL 3	49.6	5.9	41.1	3.5
ECL 5	44.3	6.1	45.8	3.8
ECL 6	44.4	6.0	45.6	4.0
MWL	62.4	5.5	31.2	0.8
Holzspäne	47.3	6.3	45.8	0.6

* Elementaranalyse durchgeführt von Frau S. Fritsch und Herrn Dr. H. Lerche (Institut für Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität München).

1.2.6 Aminosäureanalyse

Der recht hohe Stickstoffgehalt im extrazellulären Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL) blieb auch erhalten, wenn verschiedene Proteasen (Pronase E als Exoprotease, Trypsin und Chymotrypsin als Endoproteasen) zum Abbau von Aminosäuren eingesetzt wurden. Wegen dieser Resistenz gegenüber enzymatischem Verdau wurde eine chemisch-hydrolytische Methode zur Solubilisierung der Aminosäuren verwendet. Dazu wurde ECL (ECL 3, 5 und 6; Ernte 3, 5 bzw. 6 Tage nach Elicitor-Zugabe) in konstant siedender 6 M HCl hydrolysiert. Nach Überführung der Aminosäuren in die entsprechenden Phenylthiocarbamoyl-Derivate wurden diese mittels HPLC aufgetrennt und quantifiziert (Abb. 34).

Abb. 34. HPLC-Chromatogramm eines Aminosäurehydrolysates (Aminosäure-Phenylthiocarbamoylderivate) des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (Detektion bei 280 nm).



ECL wies einen hohen Anteil an Hydroxyprolin (26-31 %), Prolin (11-13 %), Serin (9-11 %), Lysin (7-9 %), Glycin (7-8 %) und Valin (6-8 %) auf. Eine ähnliche Aminosäure-Zusammensetzung wurde auch für gereinigte Zellwandproteine (Extensine) aus primären Zellwänden von *Acer pseudoplatanus* (Lampert und Northcote 1960) und aus Holz von *Pinus taeda* (Bao et al. 1992) beschrieben (Tab. 16).

Tab. 16. Aminosäurezusammensetzung [Mol %] eines extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL 3, 5 und 6; Ernte 3, 5 und 6 Tage nach Elicitor-Zugabe) und Vergleich mit gereinigten Extensinen aus *Acer pseudoplatanus*¹ und *Pinus taeda*² (Peaknummerierung wie in Abb. 34).

Peaknr	Aminosäure	Mol % der Aminosäure				
		ECL 3	ECL 5	ECL 6	Extensin ¹	Extensin ²
1	Hydroxyprolin	31.4	30.5	26.2	29.2	11.5
2	Asparaginsäure/Asparagin	n.d.	n.d.	1.5	0.0	8.1
3	Glutaminsäure/Glutamin	4.1	4.1	4.8	2.9	3.2
4	Serin	10.3	10.9	9.3	6.8	6.3
5	Glycin	7.4	7.2	7.7	2.0	7.9
6	Histidin	2.2	1.9	1.9	6.0	0.8
7	Arginin	1.4	1.1	1.5	0.6	2.2
8	Threonin	4.6	4.6	5.1	4.5	4.8
9	Alanin	4.5	5.0	5.4	4.1	6.4
10	Prolin	12.0	12.6	10.8	14.2	24.0
11	Tyrosin	1.2	1.3	2.0	4.6	4.1
12	Valin	6.5	6.5	7.5	6.5	5.7
13	Isoleucin	2.1	1.2	3.0	0.9	1.3
14	Leucin	2.6	2.2	3.9	1.8	3.0
15	Phenylalanin	1.2	1.5	1.8	0.7	1.5
16	Lysin	8.5	8.6	6.9	14.9	8.5

* Aminosäurehydrolyse und -analyse durchgeführt von Dr. M. Eulitz (GSF - Institut für klinische Molekularbiologie, München).

1.2.7 Kohlenhydratanalyse

Der Gesamtgehalt an Neutralzuckern betrug in sämtlichen Proben des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL) nach Maßgabe der Anthron-Methode (Ayers et al. 1976) ca. 14 % (w/w). Ein Uronsäureanteil konnte mit Hilfe der Methode von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) nicht nachgewiesen werden (die Nachweisgrenze der Methode lag bei ca. 0.3 % (w/w)). Eine Hydrolyse von ECL bei 125°C in unterschiedlichen Konzentrationen von Trifluoressigsäure setzte nur einen kleinen Teil (0.5 % (w/w) der Zucker frei. Die Resultate einer Analyse der Monosaccharid-Zusammensetzung in einem Zuckeranalysator (LC 2000, Biotronik, Hamburg) nach Fengel und Wegener (1979) sind in Tab. 17 gezeigt.

Tab. 17. Analyse der Monosaccharid-Zusammensetzung von ECL nach Hydrolyse in Trifluoressigsäure in einem Zuckeranalysator.

Monosaccharid	Galactose	Glucose	Arabinose
hydrolysierte Menge [% (w/w)]	0.2	0.2	0.1

Das Vorkommen von Cellulose-Gerüstfibrillen in Zellwänden von Pflanzen läßt sich wegen der optischen Anisotropie dieser Strukturen mit Hilfe der Polarisations-Mikroskopie nachweisen. Darin unterscheidet sich das Cellulose-Gerüst von den isotrop-amorphen Zellwand-Hemicellulosen und Lignin-Inkrusten. Der Vergleich einer polarisationsmikroskopischen Aufnahme des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen mit einer Zellstoffprobe als Referenz ist in Abb. 35 gezeigt. In der Zellstoff-Probe wurde die Kristallinität durch das Auftreten unterschiedlicher Farben nach Doppelbrechung des eingestrahlten Lichts sichtbar. Mit ECL waren solche Effekte nicht sichtbar. Demnach enthält ECL keine kristallinen Komponenten wie Cellulosefibrillen.

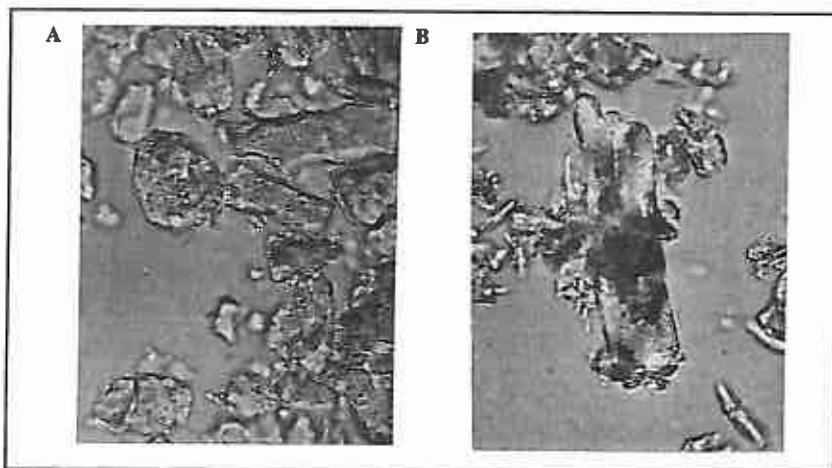


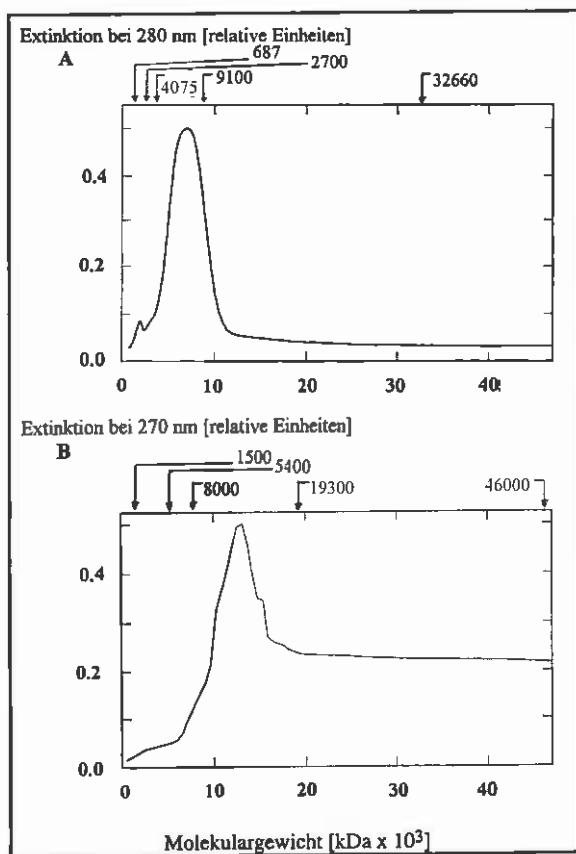
Abb. 35. Polarisationsmikroskopische Aufnahme von ECL (A) und Zellstoff (B). Die Proben wurden zuvor auf einem Objektträger mit bidest. Wasser befeuchtet. Durch Drehung einer Polarisatorlinse wurde ein Winkel von 90° zur Analysatorlinse eingestellt. Nur doppelt gebrochenes Licht erreicht dann den Analysator.

1.2.8 Gelpermeationschromatographie (HPSEC)

Die Molekulargewichtsverteilung des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL) wurde mittels HPSEC bestimmt. Dabei wurde zum einen eine HPSEC-Säule auf Dextranbasis mit Natriumphosphatpuffer (0.1 M, pH 11) betrieben (Abb. 36 A; diese

Bedingungen wurden auch von Brunow et al. (1990) für die HPSEC-Analyse eines extrazellulären Lignin-artigen Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen verwendet) und zum anderen eine Säulenkombination (unterschiedliche Porenweite des Trägermaterials) mit Polystyrol / Divinylbenzol als stationärer Phase und Dimethylformamid (DMF) als Laufmittel (Abb. 36 B) verwendet. Die Molekulargewichtsverteilung von ECL 3 (Ernte 3 Tage nach Elicitor-Zugabe) und einer Zellwandprobe aus Fichtenholz (SWL) war für beide Laufmittelsysteme recht ähnlich. ECL 3 wies zwei Maxima mit ca. 16500 KDa (Hauptpeak) und ca. 2.0×10^5 KDa im Phosphatpuffer-System auf. Mit DMF als Eluens wurden 7050 (Hauptpeak) und 1.4×10^6 KDa ermittelt. SWL zeigte im Phosphatpuffer-System Maxima bei 14100 (Hauptpeak) und 2.2×10^5 KDa, in DMF wurden 2700 (Hauptpeak) und 1.2×10^6 KDa bestimmt (keine Abb.). Die Kurvenverläufe und Molekulargewichtsmaxima für ECL 5 und 6 (Ernte 5 bzw. 6 Tage nach Elicitor-Zugabe) waren mit ECL 3 fast identisch. In keiner Polymerprobe wurden niedermolekulare Anteile nachgewiesen.

Abb. 36. Molekulargewichtsverteilung eines extrazellulären Polymers aus Fichten-Zellkulturen (ECL 3; Ernte 3 Tage nach Elicitor-Zugabe) durch HPSEC mit zwei verschiedenen Laufmittelsystemen: **A** DMF-System, **B** Phosphatpuffer-System (Details siehe II 10.7). Die Molekulargewichte der Polystyrol- (für System A) und Polystyrolsulfonat- (für System B) Standards sind als Pfeile eingezeichnet.



1.2.9 Alkalische und saure Hydrolyse

Für die Analyse von hydrolytisch zugänglichen Bestandteilen des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL) wurde das ligninartige Material bei 80°C für 4 h in 0.1 M NaOH und anschließend bei 100°C für 4 h in 6 M HCl hydrolysiert. Die bei den zwei Hydrolyseschritten freigesetzten Substanzen wurden unabhängig voneinander mittels Dioden-Array-HPLC in einem Methanol/Wasser-Gradienten aufgetrennt und charakterisiert (Abb. 37). Diese Daten wurden mit jenen von geeigneten Standards verglichen (Tab. 18).

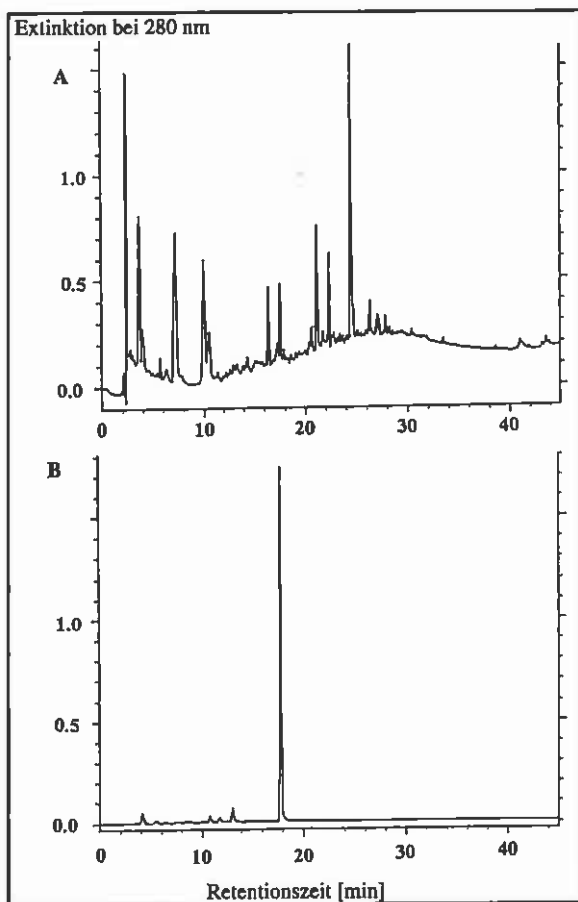


Abb. 37. HPLC-Chromatogramme von Substanzen, die hydrolytisch aus dem extrazellulären Polymer der Fichten-Suspensionskulturen freigesetzt wurden. (A) 0.1 M NaOH bei 80°C (4 h), (B) 6 M HCl bei 100°C (4h). Messung der Absorption bei 280 nm, für Fluoreszenzmessung Anregung bei 300 nm, Emission bei 400 nm.

Tab. 18. Vergleich der Eigenschaften der aus dem extrazellulären Polymer von Fichten-Suspensionskulturen unter hydrolytischen Bedingungen freigesetzten Substanzen mit Standards von verschiedenen Zellwandphenolen mittels Dioden-Array-HPLC.

Retentionszeit [min]	Zuordnung	Extinktionsmaximum [nm]	Signalintensität UV (280 nm) / Fluoreszenz (Anregung 300 nm, Emission 400 nm)
Alkalische Hydrolyse (80°C, 4 h)			
7.2	?	260	1.67
10.0	?	258	1.07
16.4	?	266	keine Fluoreszenz
17.6	?	276	keine Fluoreszenz
21.2	?	280	0.85
22.3	?	286	keine Fluoreszenz
24.5	Vanillin	278, 306	17.8
Saure Hydrolyse (100°C, 4 h)			
17.75	?	276	keine Fluoreszenz
Standards verschiedener Zellwandphenole			
12.3	Tyramin	274	keine Fluoreszenz
19.3	<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	275	keine Fluoreszenz
21.5	<i>p</i> -Cumarylalkohol	258	keine Fluoreszenz
21.9	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	280	keine Fluoreszenz
24.1	Coniferylalkohol	265, 300	0.32
24.8	Vanillin	280, 309	16.23
25.4	<i>p</i> -Cumarsäure	290, 310	5.46
26.5	Ferulasäure	287, 315	5.33
31.2	Kaempferol-3-O-glucosid	265, 350	keine Fluoreszenz

Die hydrolysierten Substanzen aus ECL konnten im wesentlichen nicht den verwendeten Standards zugeordnet werden. Einzig Vanillin wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit durch alkalische Hydrolyse aus ECL freigesetzt. Diese Zuordnung wurde zusätzlich durch Co-Einspritzung des Vanillin-Standards zum ECL-Hydrolysat in der HPLC bestätigt.

1.3 Untersuchungen zur Biosynthese des extrazellulären Polymers

1.3.1 Dehydrierungspolymerisate als Modellsysteme

Zur Simulation der Bedingungen während der Biosynthese von Ligninen wurden verschiedene Ansätze zur *in vitro*-Synthese von Ligninen, sogenannte Dehydrierungspolymerisate, verwendet. Auf diese Weise sollten Hinweise bezüglich der Voraussetzungen für die Synthese eines erhöhten Anteils von kondensierten Bindungen, wie sie im ligninartigen Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen zu finden sind, gewonnen werden. Dabei wurden zum einen Coniferylalkohol (DHPs 1-7) und zum anderen eine Mischung aus Coniferylalkohol und *p*-Cumarylalkohol als phenolische Substrate für die Polymerisation

eingesetzt (DHPs 8-14). DHP 1 wurde in leichter Abwandlung nach einer Vorschrift von Freudenberg (1968) aus Coniferylalkohol und H_2O_2 unter Katalyse von Meerrettich-Peroxidase synthetisiert. Für DHP 2 wurde H_2O_2 *in situ* mittels der Oxidation von Glucose durch Glucose-Oxidase erzeugt. Der von Glucose-Oxidase für die Bildung von H_2O_2 benötigte Sauerstoff wurde langsam über eine Glaskapillare in die Reaktionslösung eingeleitet (ca. 60 Blasen pro Minute). Dadurch sollte eine niedrige aktuelle Konzentration von H_2O_2 am Synthesort erreicht werden. Eine *in situ*-Erzeugung von Coniferylalkohol wurde durch Einwirkung von β -Glucosidase auf Coniferin, das Glucosid von Coniferylalkohol erreicht (DHP 3). Somit sollte die aktuelle Konzentration des zweiten Substrats möglichst niedrig gehalten werden. In DHP 4 wurden beide Ansätze (s. DHPs 2 und 3) zur Reduktion der aktuellen Substratkonzentrationen vereinigt, das heißt, sowohl die H_2O_2 -Produktion durch das enzymatische System Glucose-Oxidase/Glucose als auch die Coniferylalkohol-Synthese mittels des β -Glucosidase/Coniferin-Systems fanden Verwendung. Des weiteren wurden Enzympräparationen aus dem Medium (DHP 5), von ionisch an die Zellwand gebundenen (DHP 6) und zellulären (DHP 7) Enzymen der Fichten-Suspensionskultur zur DHP-Synthese eingesetzt. Das gleiche Procedere wie für die DHPs 1-7 beschrieben wurde mit *p*-Cumarylalkohol als weiterem Substrat wiederholt (DHPs 8-14). Der Anteil des eingesetzten *p*-Cumarylalkohol betrug in sämtlichen Fällen 19 % von Coniferylalkohol und spiegelte damit in etwa den molaren Anteil von den im extrazellulären Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen nachgewiesenen *p*-Hydroxyphenyleinheiten wieder (s. III 1.2.2).

Thioacidolyse und Desulfurierung

Zur Charakterisierung der Dehydrierungspolymerisate (DHPs) wurde wie schon unter III 1.2.2 für die Analyse des Zellkulturlignins die Thioacidolyse genutzt (Zuordnung der Produkte siehe ebenfalls III 1.2.2). Die Quantifizierung der monomeren Thioacidolyse-Abbauprodukte liefert Informationen über die Zusammensetzung des Polymers aus den unterschiedlichen Monolignolen und das Vorkommen von Hydroxymethylalkohol bzw. -aldehyd-Seitenketten, während dimere Produkte die relative Bedeutung der verschiedenen quervernetzenden Struktureinheiten widerspiegeln. Die Ausbeute des Hauptproduktes der Thioacidolyse lag vor allem für die DHPs, die mit Zellkultur-Enzymen synthetisiert wurden, deutlich unter jener der sonstigen DHPs (Tab. 19 A, B). Charakteristisch für sämtliche DHPs war der im Vergleich zu Holzlignin (SWL) recht hohe Anteil (> 20 % gegenüber 7 %) an Coniferylalkohol-Endgruppen (5 + 6). Ansonsten war die Monomer-Zusammensetzung jener von SWL sehr ähnlich. In den DHPs 8, 9 und 13 war der Gehalt an *p*-Hydroxyphenyl-Monomer 3 (17 % des Guajacyl-Hauptproduktes 1) in etwa gleich dem für die Synthese eingesetzten molaren Anteil von *p*-Cumarylalkohol (19 %). In den DHPs 10 und 11 war der relative Anteil von 3 recht niedrig (3 %), in den DHPs 12 (zelluläre Enzyme aus der Fichten-Suspensionskultur; 57 %) und 14 (extrazelluläre Enzyme aus der Zellkultur; 33 %) deutlich

höher als das molare Verhältnis der eingesetzten Substrate. Der Einbau von *p*-Cumarylalkohol als zweitem Monomer veränderte das Verhältnis der einzelnen Thioacidolyseprodukte zueinander nur unmerklich.

Tab. 19. Analyse der monomeren Thioacidolyse-Produkte von Dehydrierungspolymerisaten (DHPs; A: DHP 1-7, B: DHP 8-14). Für Detailinformationen siehe Text. Die Strukturen der Thioacidolyse-Monomere 1-6 sind bei III 1.2.2 abgebildet.

A (Coniferylalkohol als Monolignol)							
Verbindung	DHP 1 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 2 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 3 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 4 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 5 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 6 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 7 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]
1	630 (100%)	620 (100%)	600 (100%)	430 (100%)	260 (100%)	45 (100%)	105 (100%)
2	16 (3%)	25 (4%)	-	10 (2%)	-	-	-
4	41 (7%)	41 (7%)	38 (6%)	18 (4%)	17 (7%)	3 (7%)	7 (7%)
5,6	220 (35%)	168 (27%)	119 (20%)	90 (21%)	64 (25%)	14 (31%)	29 (28%)
Ausbeute	907	854	757	548	341	62	141
% Dimere	38	37	31	36	35	38	35

B (Coniferylalkohol und <i>p</i> -Cumarylalkohol als Monolignole)							
Verbindung	DHP 8 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 9 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 10 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 11 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 12 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 13 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	DHP 14 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]
1	500 (100%)	620 (100%)	490 (100%)	480 (100%)	67 (100%)	42 (100%)	52 (100%)
2	21 (4%)	18 (3%)	14 (3%)	15 (3%)	2 (3%)	2 (5%)	2 (4%)
3	83 (17%)	101 (16%)	15 (3%)	15 (3%)	38 (57%)	9 (21%)	17 (33%)
4	33 (7%)	55 (9%)	31 (6%)	34 (7%)	4 (6%)	4 (10%)	5 (10%)
5,6	149 (30%)	191 (31%)	204 (42%)	189 (39%)	32 (48%)	14 (33%)	9 (17%)
Ausbeute	786	985	754	733	143	71	85
% Dimere	31	31	n.q.	25	n.q.	n.q.	n.q.

n.q. = nicht quantifizierbar.

Der Anteil dimerer Thioacidolyse-Reaktionsprodukte bezogen auf das Guajacyl-Monomer 1 variierte zwischen 25 und 38 %. Wegen der geringen Probenmenge konnten allerdings dimere Strukturen in den DHPs 10 und 12-14, wo der Dimeranteil besonders niedrig lag, nicht akkurat quantifiziert werden. In den sonstigen DHPs lag der Dimeranteil meist über 30 % und war damit höher als im Holzlignin der Fichte (SWL; 25 %). Dies weist auf das Vorkommen eines recht hohen Anteils von hydrolytisch schwer zugänglichen, sogenannten kondensierten Bindungen, hin. Der relative Anteil an B-1 (4-10 %)- und 4-O-5 (2-3 %)-Struktureinheiten war vergleichbar mit dem extrazellulären Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL; 9-10 % B-1, 3-4 % 4-O-5) und lag deutlich unter dem Wert in SWL (28 % B-1, 6,5 % 4-O-5; Tab. 20). Die relative Ausbeute von B-B-Strukturen variierte bei den DHPs zwischen 13 und 23 % und lag damit unter dem Wert von ECL (23-24 %), jedoch höher als in SWL (Spuren). Jene DHPs, bei denen die aktuelle Konzentration an Substraten erniedrigt wurde (DHPs 2-4 und 9-11), zeigten eine gegenüber der Standardprozedur (DHP 1) erniedrigten Gehalt an B-B-Strukturen

(13-19 % gegenüber 20 %). Der Anteil an 8-5-Einheiten erreichte in den DHPs Werte von 48-62 % und war damit höher als in SWL (30 %) und ECL (35-40 %). In jenen DHPs, die mit Enzympräparationen aus den Fichten-Suspensionskulturen synthetisiert wurden (DHPs 5-7), lag die relative Ausbeute an 8-5-Dimeren unterhalb der in den sonstigen DHPs. Der relative Gehalt an 5-5-Struktureinheiten variierte in den DHPs zwischen 7 und 29 % und lag damit deutlich niedriger als in SWL (33 %) und ECL (24-26 %). In den mit niedrigen aktuellen Substratkonzentrationen (DHPs 2-4) und Zellkultur-Enzymen (DHPs 5-7) synthetisierten Polymeren lag der Gehalt an 5-5-Einheiten mit 22-29 % relativ nah am Wert von SWL und ECL.

Tab. 20. Analyse der dimeren Thioacidolyse-Produkte von Dehydrierungspolymerisaten (DHPs). Für Detailinformationen siehe Text. Die Strukturen der Thioacidolyse-Dimere 7-14 sind unter III 1.2.2 abgebildet.

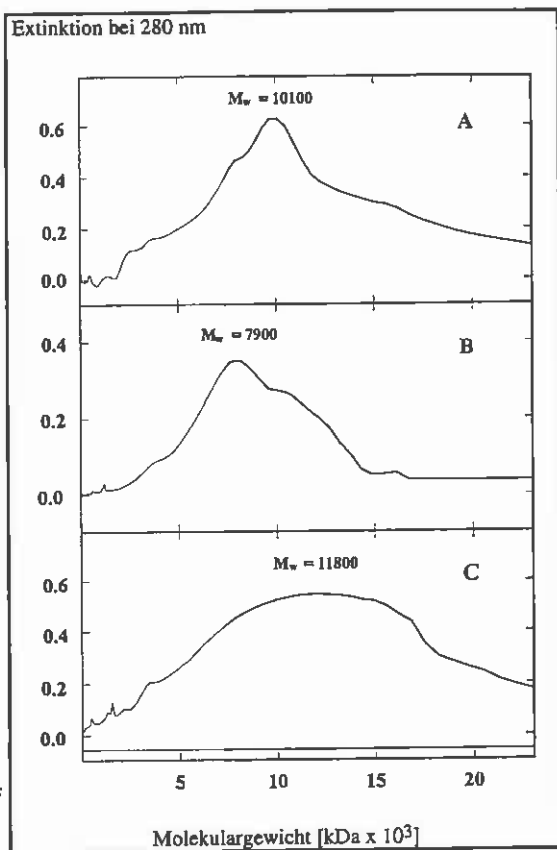
Dimere Bindungstyp	7 + 8 5-5	9 + 10 8-5	11 + 12 8-8	13 8-1	14 4-O-5
Relative Mol % der G-G-Dimere					
DHP 1	19	54	20	4	3
DHP 2	29	50	13	5	3
DHP 3	23	54	14	8	2
DHP 4	22	53	17	6	2
DHP 5	22	48	23	5	2
DHP 6	23	48	23	5	2
DHP 7	20	55	17	6	2
DHP 8	14	60	16	8	2
DHP 9	7	62	19	10	2
DHP 11	20	58	15	5	2

n.q. = nicht quantifizierbar.

Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung

Die Molekulargewichtsverteilung wurde für sämtliche DHPs mittels HPSEC bestimmt. Dabei wurde eine Säulenkombination auf der Basis von Polystyrol/Divinylbenzol als stationärer Phase mit Dimethylformamid als Laufmittel verwendet. In keinem der synthetisierten DHPs wurden niedermolekulare Bestandteile (mit einem Molgewicht kleiner 1000 Da) nachgewiesen. Die Polymere eluierten als breite Peaks mit Molekulargewichtsmaxima zwischen 7 und 12 kDa. Damit war die Molekulargewichtsverteilung der DHPs im Bereich von 2-15 kDa jener vom extrazellulären Polymer aus Fichten-Suspensionskulturen (ECL) und Fichtenholz (SWL) recht ähnlich. Allerdings wiesen die DHPs, im Gegensatz zu ECL und SWL, kein weiteres Maximum im höhermolekularen Bereich (> 100 kDa) auf. Drei charakteristische Chromatogramme von DHPs sind stellvertretend in Abb. 38 gezeigt.

Abb. 38. Molekulargewichtsverteilung von Dehydrierungspolymerisaten, ermittelt durch HPSEC im DMF-Laufmittelsystem (Details siehe Text). Katalyse der Polymerisation durch Enzympräparationen aus Fichten-Suspensionskulturen.
A zelluläre Enzyme
B ionisch-gebundene Enzyme
C extrazelluläre Enzyme
 Die Molekulargewichte der Polystyrol-Standards sind als Pfeile eingezeichnet.



1.3.2 Auswirkung der Elicitorbehandlung auf die Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe

Die Analyse phenolischer Inhaltsstoffe in Zellen, der Zellwand und im Kulturmedium von unbehandelten und Elicitor-induzierten Fichten-Suspensionskulturen sollte die Frage klären, ob Vorstufen der Ligninbiosynthese in diesen Fraktionen auftreten und damit Hinweise auf die Lokalisation der Synthesestufen des extrazellulären ligninartigen Polymers (ECL) zu erhalten wären. Ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes der Zellen aus einem unbehandelten Kontrollkolben ist in Abb. 39 gezeigt. Die Zuordnung der auftretenden Peaks wurde durch Vergleich der Dioden-Array-Spektren mit jenen von geeigneten Standards und anschließende Co-Chromatographie erreicht (Tab. 21).

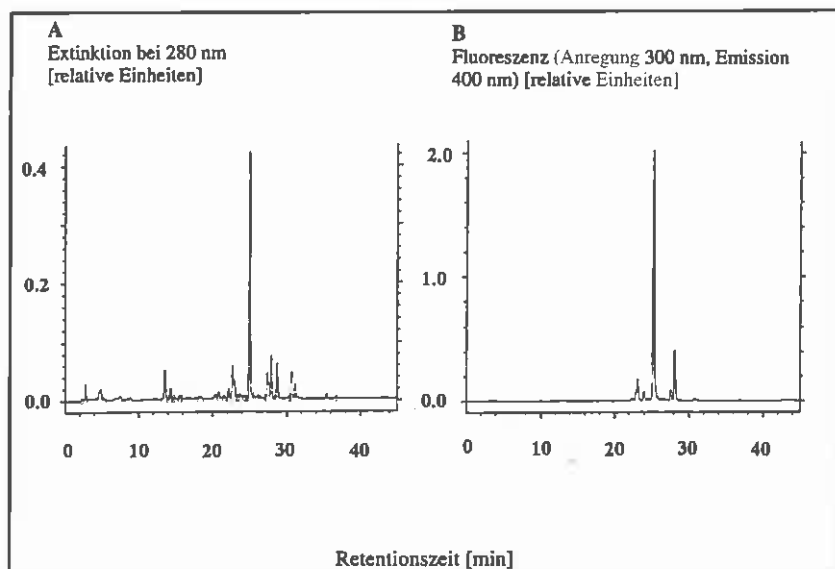


Abb. 39. HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus Fichtenzellen (A Extinktion bei 280 nm; B Fluoreszenz, Anregung bei 300 nm, Emission bei 400 nm).

Tab. 21. Eigenschaften von (A) Inhaltsstoffen in methanolischen Extrakten von Fichten-Suspensionskulturen und (B) Standards von Inhaltsstoffen der Fichte. Zuordnung mittels Dioden-Array-HPLC in einem Methanol/Wasser-Gradienten.

Retentionszeit [min]	Zuordnung	Extinktionsmaximum [nm]	Signalintensität UV (280 nm) / Fluoreszenz (Anregung 300 nm, Emission 400 nm)
Methanolischer Extrakt			
13.6	?	270	keine Fluoreszenz
22.8	?	278	keine Fluoreszenz
25.1	Astringin	302, 324	0.13
27.9	Isorhapontin	302, 324	0.13
28.7	?	267	
30.7	?	280	1.74
Standards phenolischer Inhaltsstoffe von Fichte			
18.4	Picein	266	keine Fluoreszenz
19.2	Catechin (Flavanol)	278	8.66
20.6	Coniferin (Phenylpropanglucosid)	292	0.31
22.5	p-Cumarylalkohol (Phenylpropan)	258	1.75
24.6	Coniferylalkohol (Phenylpropan)	262	0.25
25.1	Astringin (Stilben)	302, 324	0.13
27.9	Isorhapontin (Stilben)	302, 324	0.13
29.5	Matairesinol (Lignan)	282	keine Fluoreszenz
32.1	Pinoresinol (Lignan)	280	5.03

Neben einigen bisher noch unbekannten Substanzen konnten nach Maßgabe der Ergebnisse aus der Dioden-Array-HPLC die Stilbene Astringin und Isorhapontin nachgewiesen werden. Die Strukturen beider Stilbene sind in Abb. 40 wiedergegeben.

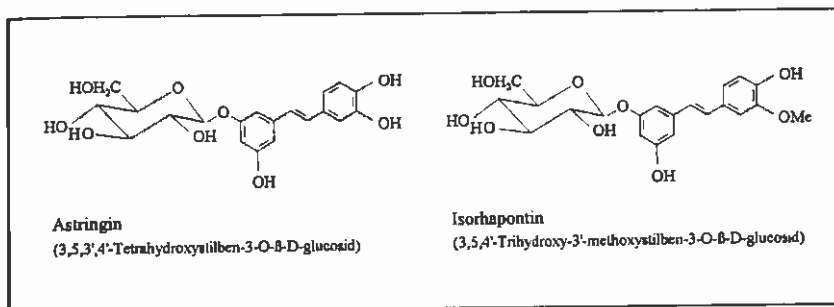
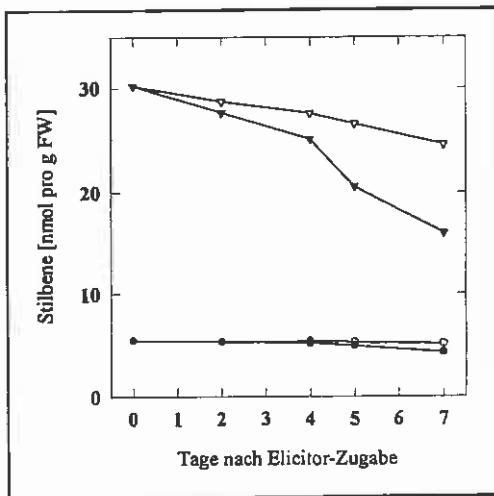


Abb. 40. Bezeichnung und Strukturen der in Fichten-Zellkulturen nachgewiesenen Stilbene.

Die Auswirkung der Elicitor-Behandlung (1.0 ml Elicitorlösung pro 35 ml Zellkulturmedium, s. III 1.1) auf die Mengen von Astringin und Isorhapontin in methanolischen Extrakten von Fichtenzellen ist in Abb. 41 dargestellt. Für beide Stilbene wurde eine Abnahme der Konzentration im Kulturverlauf der unbehandelten Kontrollkulturen beobachtet (Astringin von 30 auf 25 nmol pro Gramm Frischgewicht, Isorhapontin von 5 auf 4 nmol pro Gramm Frischgewicht). Die Elicitor-Zugabe verstärkte diese Abnahme auf 16 nmol pro Gramm Frischgewicht (Astringin) bzw. 3 nmol pro Gramm Frischgewicht (Isorhapontin).

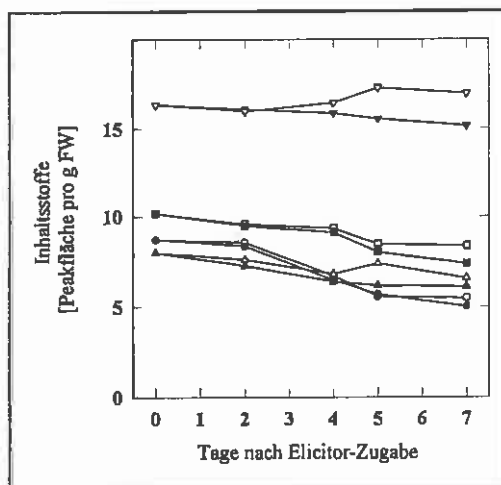
Abb. 41. Elicitor-induzierte Abnahme der Konzentration von Astringin und Isorhapontin in methanolischen Extrakten von Fichten-Suspensionskulturen.
Symbole: -▽- Astringin (Kontrolle);
-▼- Astringin (Elicitor-Behandlung);
-□- Isorhapontin (Kontrolle);
-●- Isorhapontin (Elicitor-Behandlung).



Auch die Konzentrationen der weiteren Methanol-extrahierbaren Inhaltsstoffe nahmen im Verlauf des Experiments in Kontrollkulturen, mit Ausnahme der Substanz bei 22.8 min, ab (Abb. 42). Nach Elicitorzugabe gingen die Konzentration aller dieser Substanzen um einen Faktor von ca. 1.1 zurück. Die Substanzmengen können nur in relativen Flächeneinheiten bei HPLC-Detektion (280 nm; bezogen auf 200 mg Einwaage) angegeben werden, da deren Identität bisher nicht aufgeklärt ist.

Abb. 42. Elicitor-induzierte Abnahme der Konzentration verschiedener Inhaltsstoffe in methanolischen Extrakten von Fichten-Suspensionskulturen.

Symbole: ○ R_t 13.6 min (Kontrolle);
● R_t 13.6 min (Elicitor-Behandlung);
▽ R_t 22.8 min (Kontrolle);
▼ R_t 22.8 min (Elicitor-Behandlung);
□ R_t 28.7 min (Kontrolle);
■ R_t 28.7 min (Elicitor-Behandlung);
△ R_t 30.7 min (Kontrolle);
▲ R_t 30.7 min (Elicitor-Behandlung).



Nach alkalischer Hydrolyse von Zellwandpräparationen aus Fichten-Suspensionskulturen in 0.1 M NaOH bei 80°C für 4 h wurden im Hydrolysat mittels Dioden-Array-HPLC drei bisher nicht identifizierte Hauptkomponenten (R_t 12.6, R_t 12.9 und R_t 27.5 min) detektiert (Tab. 22), deren Konzentrationen sich im Kulturverlauf kaum veränderten (Abb. 43 A). Die Elicitor-Behandlung führte zu einer leichten Konzentrationsabnahme sämtlicher alkalisch hydrolysierbarer Substanzen um den Faktor 1.1. Eine nachfolgende saure Hydrolyse des Rückstands nach alkalischer Hydrolyse in 5 M HCl bei 100°C führte zur Freisetzung einer weiteren Komponente (R_t 16.3 min; Tab. 22), deren Gehalt über den Kultivierungszyklus um den Faktor 2.3 anstieg (Abb. 43 B). Nach Elicitorbehandlung fiel die Konzentration der sauer hydrolysierten Substanz im Verlauf des Experiments auf ca. 60 % des Wertes in den Kontrollen. Im Medium der Fichten-Suspensionskulturen wurde das Vorkommen von drei nicht identifizierten mit Ethylacetat extrahierbaren Hauptkomponenten mittels Dioden-Array-HPLC belegt (Tab. 22). Die Konzentrationen der drei Substanzen stiegen im Verlauf des Kulturzyklus leicht (Faktor 1.5 für R_t 30.1 min) bzw. deutlich (Faktor 8.3 für R_t 34.0 min; Faktor 11.6 für R_t 34.8 min) an. Nach Elicitor-Zugabe war die Endkonzentration der aus dem Medium extrahierten Inhaltsstoffe ähnlich der in Kontrollkulturen (R_t 30.1 min) bzw. deutlich

niedriger (Faktor 2.8 für R_t 34.0 min; Faktor 3.5 für R_t 343.8 min; Abb. 43 C). Die Substanzmengen können nur in relativen Flächeneinheiten bei HPLC-Detektion (280 nm; bezogen auf mg Zellwandmaterial) angegeben werden, da deren Identität bisher nicht aufgeklärt ist.

Abb. 43. Auswirkung der Elicitor-behandlung von Fichten-Suspensionskulturen auf die Konzentration von Inhaltsstoffen der Zellwände und des Kulturmediums.

(A) Alkalische Hydrolyse der

Zellwände (0.1 M NaOH, 80°C, 4 h)

Symbole: ○ R_t 12.6 min (Kontrolle)

● R_t 12.6 min (Elicitor-Behandlung)

▽ R_t 12.9 min (Kontrolle)

▼ R_t 12.9 min (Elicitor-Behandlung)

□ R_t 27.5 min (Kontrolle)

■ R_t 27.5 min (Elicitor-Behandlung).

(B) Saure Hydrolyse der Zellwände

(6 M HCl, 100°C, 4 h)

Symbole: ○ R_t 16.3 min (Kontrolle)

● R_t 16.3 min (Elicitor-Behandlung).

(C) Kulturmedium (Extraktion gegen

Ethylacetat)

Symbole: ○ R_t 30.1 min (Kontrolle)

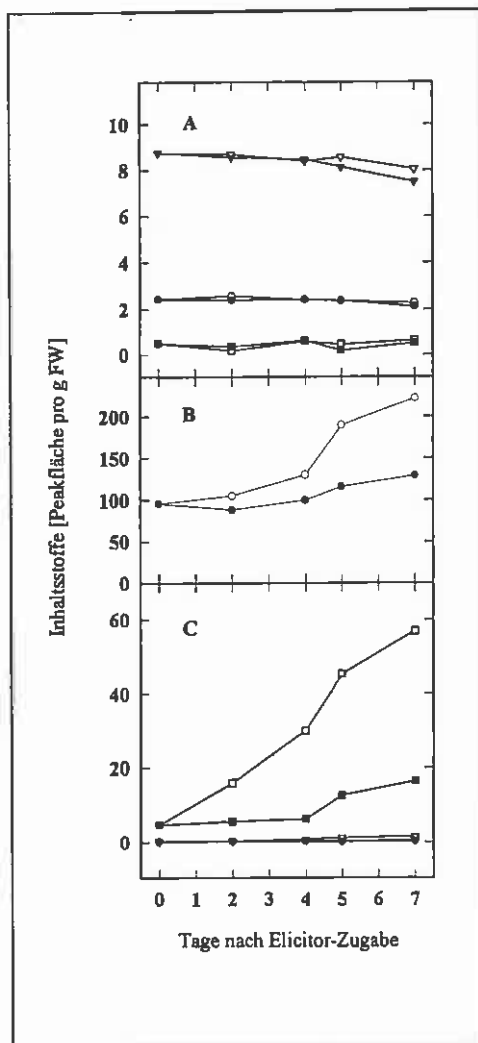
● R_t 30.1 min (Elicitor-Behandlung)

▽ R_t 34.0 min (Kontrolle)

▼ R_t 34.0 min (Elicitor-Behandlung)

□ R_t 34.8 min (Kontrolle)

■ R_t 34.8 min (Elicitor-Behandlung).



Tab. 22. Eigenschaften der aus Zellwandpräparationen von Fichten-Suspensionszellen durch alkalische und saure Hydrolyse freigesetzten bzw. aus dem Kulturmedium extrahierten Substanzen (ermittelt durch Dioden-Array-HPLC in einem Methanol/Wasser-Gradienten).

Retentionszeit [min]	Zuordnung	Extinktionsmaximu m [nm]	Signalintensität UV (280 nm) / Fluoreszenz (Anregung 300 nm, Emission 400 nm)
Alkalische Hydrolyse			
12.6	?	264	keine Fluoreszenz
12.9	?	255, 280	2.6
27.5	?	276	keine Fluoreszenz
Saure Hydrolyse			
16.3	?	276	keine Fluoreszenz
Medium			
30.1	?	276	keine Fluoreszenz
34.0	?	276	1.7
34.8	?	280	2.5

Nach Maßgabe der präsentierten Daten wurden keine Substanzen, die als Vorstufen der Ligninbiosynthese dienen könnten (Coniferylalkohol bzw. dessen Glucosid Coniferin, *p*-Cumarylalkohol bzw. dessen Glucosid; s. Tab. 22), in den unterschiedlichen Extrakten und Hydrolysaten nachgewiesen. Die aktuelle Konzentration der Monolignole lag demnach unterhalb der Nachweisgrenze von 30 pmol pro Testansatz, entsprechend 40-50 nmol pro Kulturkolben (35 ml Medium).

1.3.2 Auswirkung der Inhibition von Peroxidasen und Laccasen auf die Akkumulation von Zwischenprodukten der Ligninbiosynthese

Die für die Polymerisation der Monolignole benötigten Peroxidasen und Laccasen der Fichten-Suspensionskulturen wurden gleichzeitig mit der Elicitierung durch Zugabe von geeigneten Hemmstoffen inhibiert. Dieses Experiment wurde in Hinsicht auf die Vermutung unternommen, daß durch die Inaktivierung der Enzyme für die Polymerisation von Monolignolen möglicherweise eine Akkumulation dieser Ligninbiosynthese-Intermediate am Ort der Biosynthese stattfände. Da nach Elicitor-Behandlung in methanolischen Extrakten, in Zellwandpräparationen und im Medium der Zellkulturen keine Monolignole nachweisbar waren, wären durch eine derart erzwungene Akkumulation unter Umständen Hinweise auf den Ort der Ligninbiosynthese zu gewinnen. Peroxidasen wurden mit 0.005 M und 0.01 M *n*-Propylgallat, Laccasen mit gleichen Konzentrationen Diethyldithiocarbaminsäure gehemmt. Weder Peroxidasen noch Laccasen zeigten einen Tag nach Zugabe der Inhibitoren eine Enzymaktivität nach Maßgabe der bei II 14.3 beschriebenen Methoden der Aktivitätsbestimmung. Eine Aktivität von Peroxidasen und Laccasen war auch 5 Tage nach Inhibitor-Zugabe nicht meßbar. Es konnte mit Hilfe der LTGA-Methode über die gesamte Periode des

Experimente keine Bildung von Lignin festgestellt werden. Wie die HPLC-Chromatogramme zeigen, wurden die schon beschriebenen Inhaltsstoffe aus den Zellen und dem Kulturmedium extrahiert (Abb. 44). Die Konzentration der Inhaltsstoffe lag um den Faktor 1.3-2.5 unterhalb des Wertes ohne Zugabe der Inhibitoren. Entgegen der oben beschriebenen Annahme konnten nach Maßgabe einer Dioden-Array-HPLC-Analyse weder Coniferylalkohol und *p*-Cumarylalkohol, noch deren Glucoside in Zellextrakten und dem Medium nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 40-50 nmol pro Kulturkolben (35 ml Medium)).

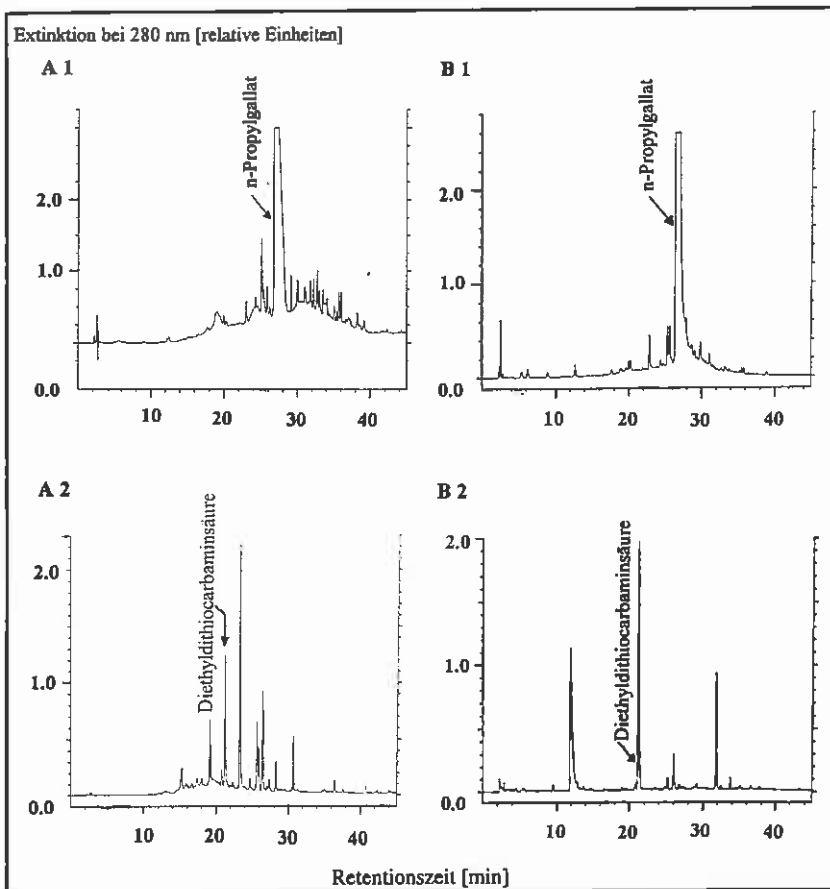
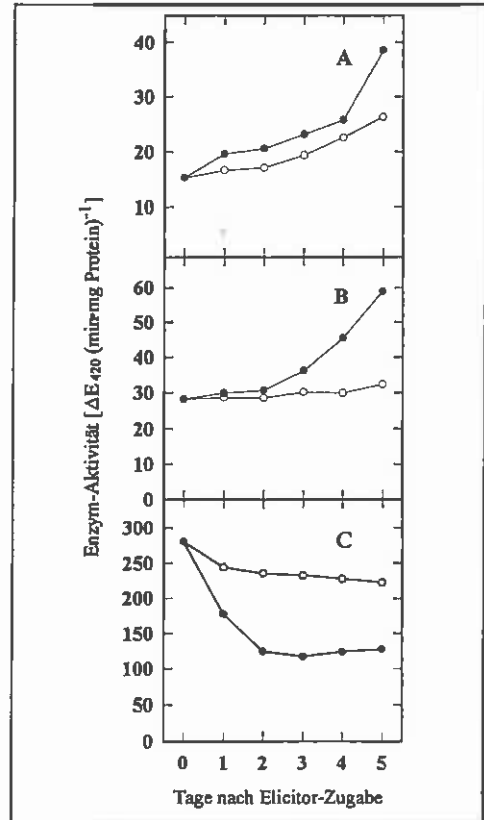


Abb. 44. HPLC-Chromatogramm von (A) Methanol-löslichen und (B) aus dem Medium extrahierten Inhaltsstoffen von Fichten-Suspensionskulturen nach gleichzeitiger Zugabe eines Rhizospaera kalkhoffii-Elicitors und entweder einem Peroxidase-Inhibitor (0.01 M *n*-Propylgallat; A 1, B 1) oder einem Laccase-Inhibitor (0.01 M Diethyldithiocarbaminsäure; A 2, B 2).

1.3.4 Auswirkung der Elicitorbehandlung auf die Peroxidase-Aktivität

Parallel zur Akkumulation eines extrazellulären ligninartigen Polymers in Fichten-Suspensionskulturen wurde ein Elicitor-vermittelter Anstieg der zellulären und ionisch an die Zellwand gebundenen Peroxidase (POD)-Aktivitäten nachgewiesen, während die Aktivität extrazellulärer Peroxidasen, die aus dem Kulturmedium gewonnen wurden, abfiel (Abb. 45).

Abb. 45. Auswirkung der Behandlung von Fichten-Suspensionskulturen mit einem Rhizosphaera kalkhoffii-Elicitor auf die Aktivität von zellulären (A), ionisch Zellwand-gebundenen (B) und extrazellulären (C) Peroxidasen.
Symbole: ○ Kontrolle
● Elicitor-Behandlung



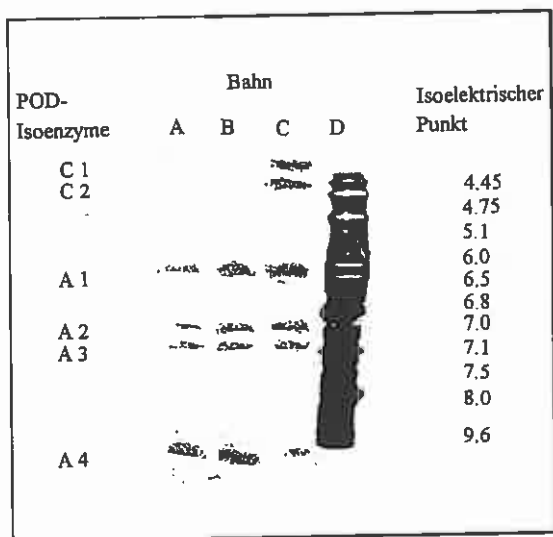
Zu Beginn des Experiments wurde für extrazelluläre PODs eine 12-18-fach höhere spezifische Aktivität ($280 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$) als für zelluläre ($15 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$) und wandgebundene ($25 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$) PODs ermittelt. Während der sechs folgenden Tage stieg die Aktivität der zellulären PODs auf $25 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ in Kontrollkulturen an. In Elicitor-behandelten Kulturen wurde ein Anstieg dieser Aktivität auf $40 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ nachgewiesen. Die Aktivität von ionisch an die Zellwand

gebundenen PODs erreichte am Ende der experimentellen Periode $32 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ in Kontrollkulturen und $60 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ nach Elicitor-Zugabe. Für extrazelluläre PODs wurde in Kontrollkulturen ein Abfall der Aktivität auf $240 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ festgestellt. Der Aktivitätsverlust in Elicitor-behandelten Kulturen war deutlicher und erreichte nach drei Tagen einen konstanten Wert von $120 \Delta E (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$.

1.3.5 Auswirkung der Elicitor-Behandlung auf das Peroxidase-Isoenzymmuster

Peroxidase-Isoenzyme aus zellulären, ionisch Zellwand-gebundenen und extrazellulären Enzympräparationen wurden mittels nativer Gelelektrophorese auf IEF-Gelen mit einem Phast-System (Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers aufgetrennt und ihre Aktivität im Gel durch eine Farbreaktion (Benzidin/Guajacol/ H_2O_2) sichtbar gemacht. Für die unterschiedlichen Enzymextrakte wurden charakteristische Isoenzymmuster nachgewiesen. Die Zuordnung der Gelbanden nach IEF erfolgte durch Vergleich mit entsprechenden Markerproteinen für den Isoelektrischen Punkt (pI). Auf diese Weise wurden vier anionische POD-Isoenzyme (bezeichnet mit A1-A4 nach zunehmendem pI) mit pI-Werten von 7.0 (A 1), 7.3 (A 2), 7.5 (A 3) bzw. >10 (A 4) und zwei kationische PODs mit pI-Werten von <4.0 (C 1) und 4.4 (C 2) nachgewiesen (Abb. 46).

Abb. 46. Isoenzymmuster von zellulären (A), ionisch Zellwand-gebundenen (B) und extrazellulären (C) Peroxidasen aus Fichten-Suspensionskulturen. Die Bestimmung des Isoelektrischen Punktes erfolgte durch Vergleich der Mobilität mit jener von Marker-Proteinen (D) nach Isoelektrischer Fokussierung.



Um den Einfluß des Elicitors auf die Aktivität einzelner Peroxidase-Isoenzyme nachweisen zu können, wurden die PODs mittels nativer anodischer und kathodischer Gelelektrophorese (PAGE; Gelapparatur Biometra, Göttingen) aufgetrennt. Die entsprechenden Gelbanden wurden durch eine *in situ*-Aktivitätsfärbung (s.o.) sichtbar gemacht.

Zur Quantifizierung der POD-Aktivität wurden die Gele auf den Probentisch eines Densitometers (CD 60, Desaga, Heidelberg) gelegt und die Transmission der Gelbänder bei 420 nm gemessen. Die Resultate sind in Abb. 47 (anodische PAGE) und Abb. 48 (kathodische PAGE) gezeigt. Die Bezeichnung der Isoenzyme erfolgt nach ihrem Migrationsverhalten, wobei die Nomenklatur der vorhergehenden Seite weiterverwendet wird.

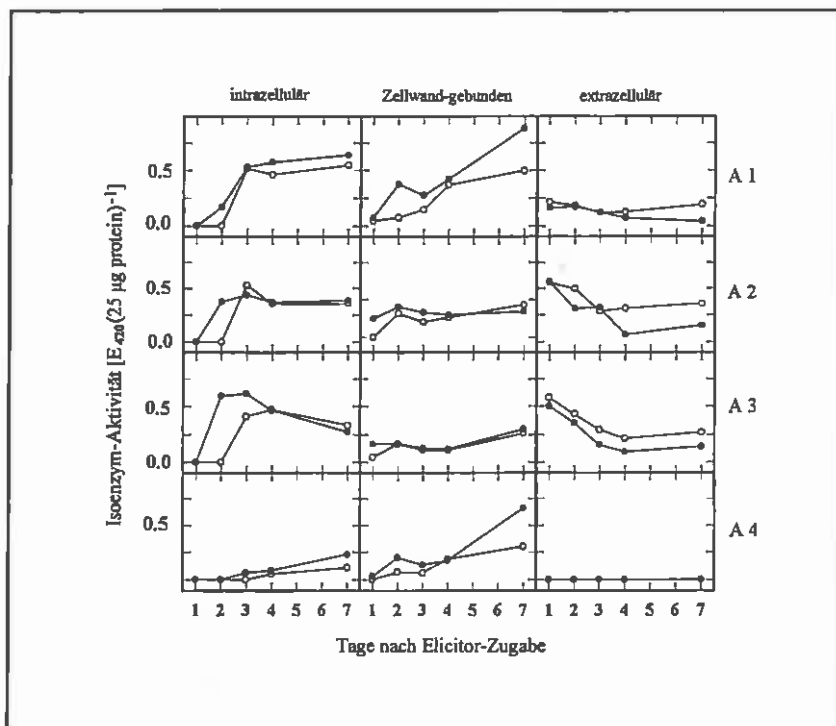


Abb. 47. Verlauf der Aktivität anionischer Peroxidase-Isoenzyme nach anodischer Gelelektrophorese und in situ-Anfärbung der Gelbänder. Die Aktivität wurde durch Messung der Transmission der entsprechenden Gelbänder im Densitometer quantifiziert. Symbole: ○—○ Kontrollkulturen; ●—● Elicitor-behandelte Kulturen.

In den Zellen aus Kontrollkulturen hatte die Aktivität von A 1, A 2 und A 3 einen annähernd sigmoiden Kurvenverlauf. Die Aktivität von A 4 stieg im Verlauf des Experiments linear an. Die Elicitor-Behandlung der Fichten-Suspensionskulturen führte, im Vergleich mit den Kontrollkulturen, zu einer leichten Induktion von A 1 und A 4. Die Aktivität von A 2 und A 3 stieg in den Elicitor-behandelten Zellen zwar zunächst schneller an als in den Zellen der Kontrollkulturen, sank aber ab dem vierten Tag nach Elicitorzugabe unter die Werte in Kontrollen ab. Sämtliche Zellwand-gebundenen anionischen POD-Isoenzyme zeigten in

Kontrollkulturen während des Kulturverlaufs einen linearen Aktivitätsanstieg. Nach Elicitor-Zugabe wurde die Aktivität von A 1 und A 4 gegenüber den Kontrollen um den Faktor 2 gesteigert, während die Aktivität von A 2 und A 3 etwa auf dem Niveau der Kontrollkulturen blieb. Die Aktivität der extrazellulären Isoenzyme A 2 und A 3 fiel in den Kontrollkulturen im Verlauf des Experiments ab, jene von A 1 blieb unverändert und für A 4 konnte die Aktivität wegen des niedrigen Wertes nicht quantifiziert werden. Sieben Tage nach Elicitierung war die Aktivität von A 1 auf 20 %, von A 2 auf 43 % und von A 3 auf 52 % des Wertes in Kontrollkulturen abgesunken.

Die Aktivität der aus Zellwänden der Fichtenzellen extrahierten kationischen Peroxidase-Isoenzyme C 1 und C 2 war erst gegen Ende des Experiments meßbar. Dabei unterschieden sich die Werte in Kontrollen und Elicitor-behandelten Zellen nicht. Zelluläre kationische Isoenzyme traten nicht auf. In Kontrollkulturen fiel die Aktivität des extrazellulären Isoenzym C 1 nach dem ersten Tag auf 60 % des Ausgangswertes ab. In den Elicitor-behandelten Kulturen war eine rasche Aktivitätsabnahme auf 10 % des Ausgangswertes zu beobachten. Im weiteren Verlauf des Experimentes stieg die Aktivität dann langsam wieder an und erreichte nach 7 Tagen 30 % der Ausgangsaktivität. Die Aktivität von C 2 lag in Kontroll- und Elicitor-behandelten Kulturen über den gesamten Zeitraum des Experiments in der Nähe der Nachweisgrenze.

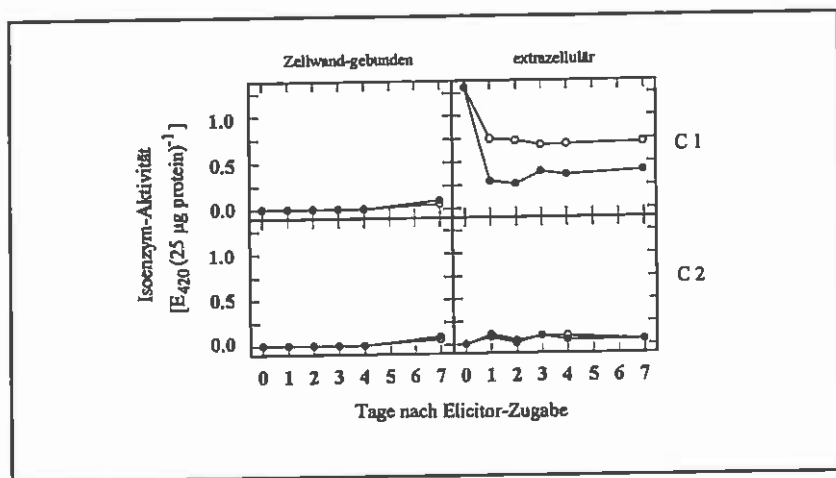


Abb. 48. Verlauf der Aktivität kationischer Peroxidase-Isoenzyme nach kathodischer Gelelektrophorese und in situ-Anfärbung der Gelbanden. Die Aktivität wurde durch Messung der Transmission der entsprechenden Gelbanden im Desitometer quantifiziert. Symbole: $\circ$ Kontrollkulturen; $\bullet$ Elicitor-behandelte Kulturen.

2. Auswirkung von Ozon auf die Biosynthese phenolischer Polymere in Fichten-Keimlingen

2.1 Makroskopische Reaktionen der Keimlinge

Schadentwicklung

Fichtenkeimlinge wurden im Alter von 6 Wochen für 9½ Wochen mit Ozonkonzentrationen von 300 und 600 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ für acht Stunden am Tag behandelt bzw. weiter in Reinluft kultiviert (Kontrollen). Als sichtbare Schäden an Nadeln der bei 300 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ Ozon kultivierten Keimlinge traten ab der 7. Woche strichförmige Nekrosen und ein Turgeszenzverlust auf. Bei den mit 600 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ Ozon exponierten Keimlingen wurden auch längere gelbliche Querstreifen und kollabiertes Gewebe beobachtet (Abb. 49). Die Hypokotyle der bei 300 und 600 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ Ozon kultivierten Keimlinge waren im Vergleich mit jenen der Kontrollkeimlinge etwas gebleicht. Weder die Nadeln noch die Hypokotyle von Kontrollkeimlingen zeigten während der Versuchsdauer Schäden.

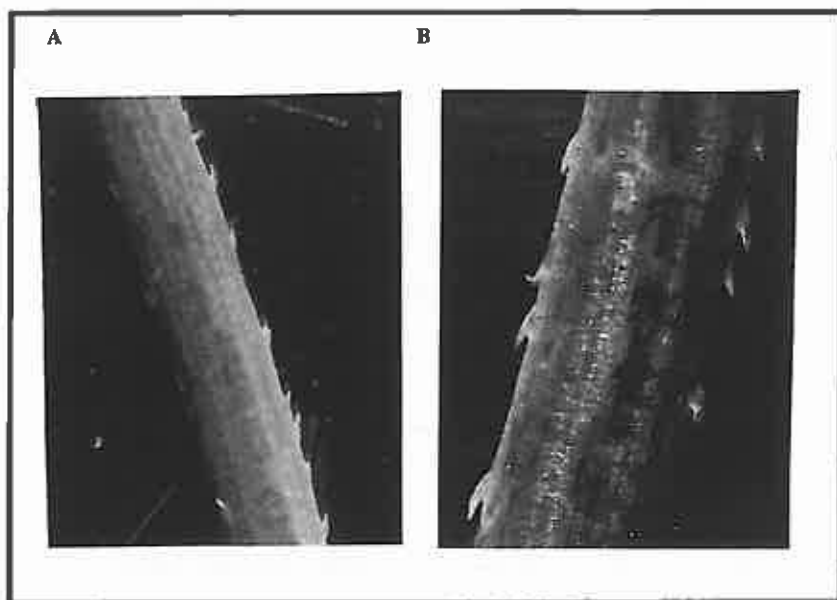
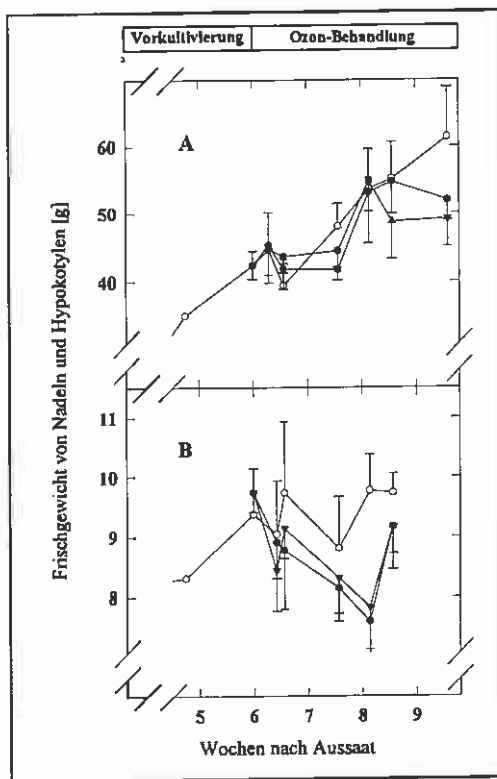


Abb. 49. Primärnadeln von Fichten-Keimlingen ohne (A) und mit (B) Ozonschäden (Vergrößerung: 70-fach). Die Ozonschäden traten an Nadeln von einigen mit 600 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ Ozon behandelten Keimlingen als gelbe Querstreifen mit kollabiertem Gewebe auf.

Wachstum

Im Laufe der ersten 58 Tage der Versuchsperiode führten die erhöhten Ozonkonzentrationen zu keinen deutlichen Unterschieden im Frischgewicht der Nadeln im Vergleich mit Kontrollkeimlingen. Erst in der letzten Woche der 65-tägigen Ozonexposition traten Dosis-abhängige Unterschiede im Nadelfrischgewicht auf. Bei einer Ozonkonzentration von $300 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ wurde eine Gewichtseinbuße von 20 % (46 mg pro Nadelkranz), bei $600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ eine Reduktion um 22 % (44 mg pro Nadelkranz) gegenüber den in Reinluft kultivierten Kontrollkeimlingen (57 mg pro Keimling) nachgewiesen (Abb. 50 A). Diese Ozon-induzierte Reduktion im Frischgewicht gegenüber Kontrollkeimlingen war bei Hypokotylen über den gesamten Versuchszeitraum deutlicher ausgeprägt als bei Nadeln. Bei den Hypokotylen wurde schon drei Tage nach Beginn der Schadgasbehandlung eine leichte Reduktion des Frischgewichts beobachtet (Abb. 50 B). Die Kurvenverläufe bei den zwei erhöhten Ozonkonzentrationen verliefen nahezu parallel und erreichten einen Endwert von 9.2 mg pro Keimling im Vergleich zu 9.7 mg pro Kontrollkeimling.

Abb. 50. Wachstumsverhalten [mg pro Keimling] der Nadeln (A) und Hypokotyle (B) von Fichten-Keimlingen über einen Zeitraum von $9\frac{1}{2}$ Wochen unter dem Einfluß von Ozon. Die Dauer der Ozonbehandlung ist oberhalb der Graphik angezeigt. Symbole: $\circ$ Kontrolle; $\bullet$ $300 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ Ozon; $\blacktriangledown$ $600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ Ozon (Dreifachbestimmung von Mischproben $\pm$ SA).

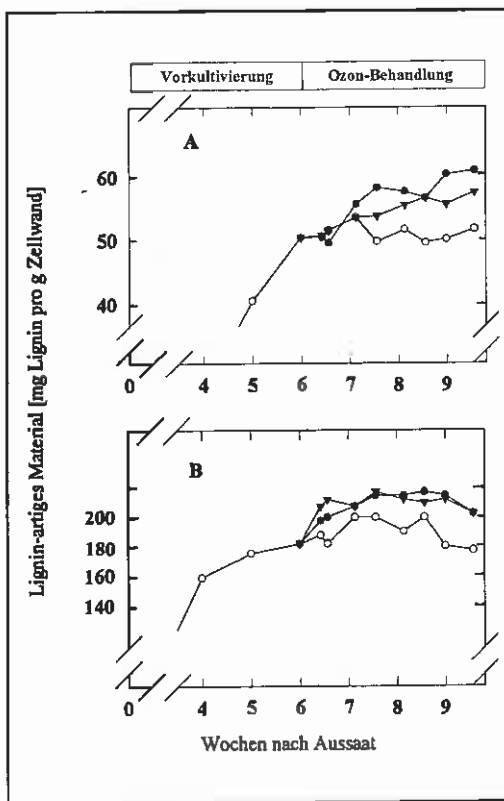


2.2 Lignin- und Suberin-Akkumulation

2.2.1 Quantifizierung phenolischer Polymere nach der LTGA-Methode

Der Einfluß erhöhter Ozonkonzentrationen (300 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ und 600 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ Ozon) auf den Gehalt phenolischer Polymere in den Zellwänden der Nadeln und Hypokotyle von Fichtenkeimlingen wurde durch Derivatisierung mit Thioglycolsäure und anschließender Quantifizierung der gebildeten Produkte mit Hilfe der LTGA-Methode (s.III 1.1) verfolgt. Zu Beginn des Experiments, also im Alter von 6 Wochen, wiesen die Keimlinge nach Maßgabe der LTGA-Methode einen Gehalt phenolischer Polymere von 51 mg (Nadeln) bzw. 182 mg (Hypokotyle) Lignin pro Gramm Zellwand auf (Abb. 51). In den Zellwänden der in Reinfluft kultivierten Keimlinge blieben die Gehalte an LTGA-Produkten in den 3½ Wochen des Experiments in etwa konstant. Diese Werte entsprechen einem Gewichtsanteil phenolischer Polymere von 5-6 % (Nadeln) bzw. 18-21 % (Hypokotyle) des Zellwandmaterials.

Abb. 51. Ozon-Effekt auf die Akkumulation von phenolischen Polymeren in Zellwänden von (A) Nadeln und (B) Hypokotylen der Fichten-Keimlinge nach Maßgabe der LTGA-Methode (Details siehe III 1.1). Symbole: $\circ$ Kontrolle; ∇ 300 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ Ozon; $\bullet$ 600 $\text{nl}\cdot\text{l}^{-1}$ Ozon (Doppelbestimmung von Mischproben)



Im Verlauf des 25-tägigen Experiments war ein Ozon-induzierter Anstieg phenolischer Polymere in Zellwänden von Nadeln auf 57 mg Lignin pro Gramm Zellwand ($300 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$) und 62 mg Lignin pro Gramm Zellwand ($600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$) gegenüber den Kontrollkeimlingen (53 mg Lignin pro Gramm Zellwand) nachzuweisen (Abb. 51 A). Demnach stieg der Anteil phenolischer Polymere im Vergleich zu den Kontrollkeimlingen um 10 % ($300 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$) bzw. 15 % ($600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$) an. Bei den Hypokotylen stieg der Gehalt an phenolischen Polymeren schon drei Tage nach Beginn der Ozonbehandlung deutlich über die Werte in Kontrollkeimlingen an (Abb. 51 B) und erreichte am Ende des Versuchszeitraums einen um 15 % erhöhten Wert von LTGA-Material für beide Behandlungsvarianten (206 mg Lignin-artiges Material pro mg Zellwand für beide erhöhte Ozonkonzentrationen) gegenüber den Kontrollen (184 mg Lignin-artiges Material pro mg Zellwand). Der Ligninanteil der Hypokotyl-Zellwände von Fichtenkeimlingen war demnach ca. 3.0-3.5-fach höher als jener der Nadeln.

2.2.2 Histochemische Lokalisierung phenolischer Polymere

Für den Nachweis phenolischer Zellwandpolymere wurden lösliche Komponenten von Nadeln und Hypokotylen der Keimlinge zunächst mittels verschiedener Ethanol/Wasser-Gemische mit steigendem Anteil Ethanol extrahiert und die Präparate in Histo-resin (LKB, Bromma, Schweden) eingebettet. Die nach Schneiden der Präparate mit Hilfe eines Mikrotoms (HM 350, Mikrom, Heidelberg) erhaltenen $10 \mu\text{m}$ -Querschnitte wurden unter dem Mikroskop (Leitz, Wetzlar) mit verschiedenen Methoden untersucht.

Bei UV-Anregung (Anregung 340-380 nm, Emission 430 nm) wurde in Nadeln und Hypokotylen von Fichten-Keimlingen eine intensive blaue Autofluoreszenz im Leitgewebe und Zellwänden beobachtet (Abb. 52 A). Eine ähnliche Verteilung der Autofluoreszenz wurde auch bei Blaulicht-Anregung (Anregung bei 450-490 nm, Emission bei 515 nm) als gelbliche Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 52 B). Das Vorkommen Suberin-artiger Polymere, die nach Inkubation mit Sudan IV/Ethanol eine orangene Färbung annehmen, wurde ausschließlich in Epidermen der Nadeln und Hypokotyle aufgezeigt (Abb. 52 C). Lignin-artiges Material, dem durch Behandlung mit Phloroglucinol/HCl eine kirschrote Färbung verliehen wurde, wurde mittels Durchlicht-Mikroskopie im Leitgewebe und in den epidermalen Zellwänden der Nadeln und Hypokotyle lokalisiert (Abb. 52 D, E). Die Lignin-Färbung war deutlich intensiver in den Zellwänden von Nadeln und Hypokotylen der mit 300 und $600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ Ozon behandelten Fichtenkeimlinge, während die Intensität der Suberin-Färbung in diesen Geweben nur geringfügige Unterschiede zwischen Ozon-exponierten und den in Reinluft kultivierten Kontrollkeimlingen zeigte (Abb. 52 E1, E2).

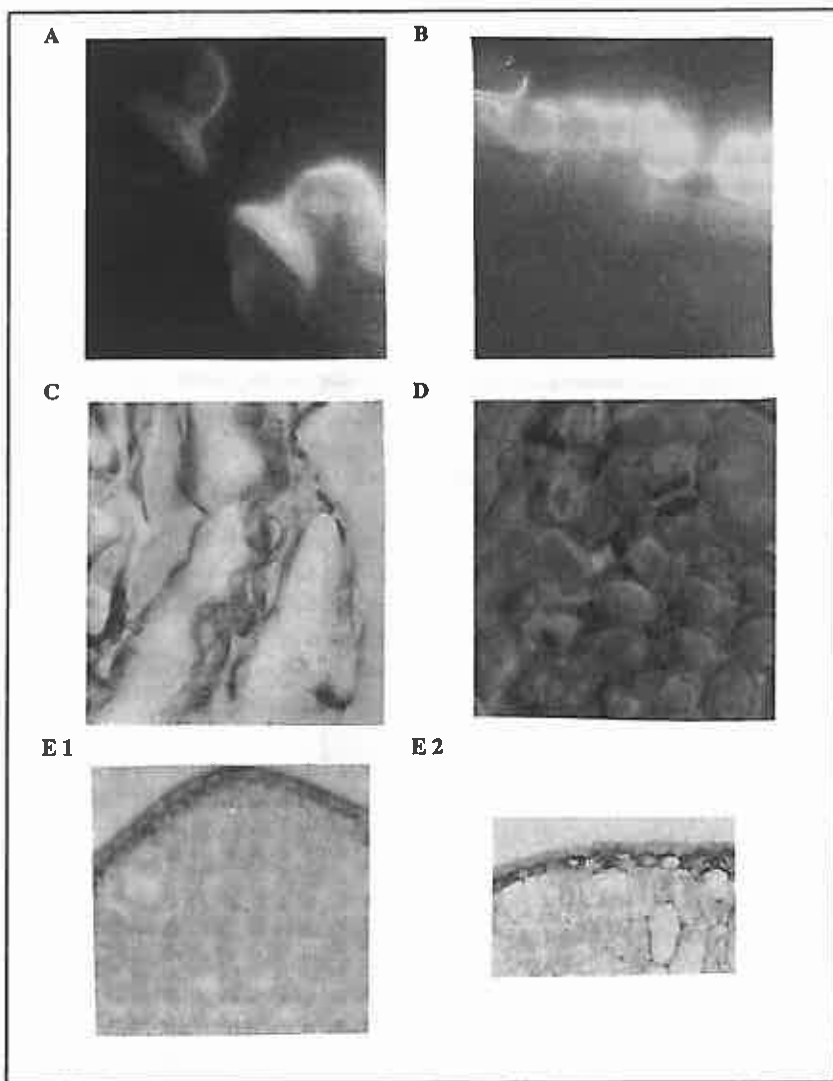


Abb. 52. Mikroskopische Aufnahmen von Nadeln und Hypokotylen von Ozon-behandelten (300 nl l^{-1} Ozon, 8 h pro Tag, nach 7 Wochen Ozon-Exposition) Fichten-Keimlingen. (A) Blaue Autofluoreszenz einer Schließzelle (Hypokotyl) bei UV-Anregung, (B) gelbe Autofluoreszenz der Zellwände (Nadel) bei Blaulicht-Anregung, (C) Sudan IV-Färbung der Zellwände eines Hypokotyls, (D) Phloroglucinol-Färbung von Leitgewebe einer Nadel, (E) Phloroglucinol-Färbung von Zellwänden der Hypokotyle von Kontroll- (E 1) und Ozon-behandelten Keimlingen (E 2).

2.2.3 Untersuchungen zur Ligninstruktur

Zur Charakterisierung der Ligninstruktur in Zellwänden von Fichtenkeimlingen wurde die Thioacidolyse, wie schon unter III 1.2.2 im Detail beschrieben, eingesetzt. Im folgenden wird für die Thioacidolyse-Produkte die gleiche Nomenklatur wie in Kapitel III 1.2.2 verwendet. Die Angabe der Konzentration der Thioacidolyse-Produkte erfolgt in μmol pro Gramm Lignin. Dazu wurden der mittels LTGA-Methode bestimmte Gehalt an ligninartigem Material in den Zellwänden von Nadeln und Hypokotylen als Bezugsgröße für die nach Thioacidolyse erhaltenen Produkt-Konzentrationen gewählt.

Analyse der Monomerenzusammensetzung

Die Ausbeute an Guajacyl-Hauptprodukt 1 nach Thioacidolyse lag in sämtlichen Keimlingsproben ($1500 \pm 240 \mu\text{mol}$ pro Gramm Lignin in Nadeln und $1075 \pm 140 \mu\text{mol}$ pro Gramm Lignin in Hypocotylen) deutlich höher als in Zellwandproben von Fichtenholz (SWL; $950 \mu\text{mol}$ pro Gramm Lignin). Der Anteil chemisch leicht spaltbarer Bindungen war in den Keimlingsproben demnach recht hoch (Tab. 23). Der Anteil des aus *p*-Hydroxyphenyl-Einheiten gebildeten Monomers 3 ($60 \pm 6 \mu\text{mol}$ pro Gramm Lignin für Nadeln und $50 \pm 7 \mu\text{mol}$ pro Gramm Lignin für Hypokotyle, entsprechend 8-9 % des Guajacyl-Monomers 1) lag weit über jenem in SWL (1%). Der relative Gehalt an Coniferylalkohol-Endgruppen (5, 6) war in Hypocotylen (5-8 % vom Guajacyl-Monomer 1) niedriger als in Nadeln (10-12 %) und entsprach etwa den Werten in SWL (7 %). Der Anteil von Coniferylaldehyd-Endgruppen (4) lag bei Hypocotylen und Nadeln von Fichtenkeimlingen (7-10 % bzw. 8-9 % von 1) recht hoch im Vergleich mit SWL (4 %).

Tab. 23. Analyse der monomeren Thioacidolyseprodukte aus (A) Nadeln und (B) Hypokotylen von Fichtenkeimlingen. Angegeben sind Mittelwerte aus jeweils zwei Thioacidolysen (in μmol pro Gramm Lignin; Quantifizierung auf Basis des Gehalts an Lignin-artigem Material laut LTGA-Methode (s. III 2.2.1)).

Verbindung	Kontrolle			300 nl l ⁻¹		600 nl l ⁻¹	
	Tag 0 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	Tag 7 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	Tag 27 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	Tag 7 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	Tag 27 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	Tag 7 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	Tag 27 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]
1	1742 (100%)	1310 (100%)	1394 (100%)	1547 (100%)	1288 (100%)	1394 (100%)	1259 (100%)
2	69.3 (4%)	65.5 (5%)	55.4 (4%)	60.1 (4%)	60.9 (5%)	57.8 (4%)	60.1 (5%)
3	142.6 (8%)	94.6 (7%)	99.3 (7%)	111.0 (7%)	83.5 (6%)	88.4 (6%)	74.4 (6%)
4	140.6 (8%)	107.4 (8%)	120.3 (9%)	169.3(11%)	127.0(10%)	151.3(11%)	85.8 (7%)
5,6	198.0(11%)	120.1 (9%)	166.2(12%)	180.2(12%)	140.9(11%)	113.9 (8%)	147.3(12%)
Ausbeute	2293	1698	1835	2068	1700	1805	1627
% Dimere	23	27	25	28	24	20	24

Fortsetzung Tab. 23, Thioacidolyse-Monomere der Hypokotyle von Fichten-Keimlingen.

B

Verbindung	Kontrolle			300 nl l ⁻¹		600 nl l ⁻¹	
	Tag 0 [μmol g ⁻¹]	Tag 7 [μmol g ⁻¹]	Tag 27 [μmol g ⁻¹]	Tag 7 [μmol g ⁻¹]	Tag 27 [μmol g ⁻¹]	Tag 7 [μmol g ⁻¹]	Tag 27 [μmol g ⁻¹]
1	1219 (100%)	1131 (100%)	930 (100%)	1114 (100%)	1101 (100%)	1123 (100%)	1019 (100%)
2	59.8 (5%)	46.8 (4%)	45.1 (5%)	45.4 (4%)	53.4 (5%)	55.0 (5%)	42.2 (4%)
3	119.7 (10%)	79.0 (7%)	61.9 (7%)	90.3 (8%)	94.6 (9%)	85.1 (8%)	93.1 (9%)
4	95.5 (8%)	69.4 (6%)	96.1 (10%)	100.9 (9%)	98.9 (9%)	87.5 (8%)	87.3 (9%)
5,6	83.4 (7%)	52.3 (5%)	83.1 (9%)	83.7 (8%)	93.1 (8%)	65.5 (6%)	71.8 (7%)
Ausbeute	1577	1379	1217	1434	1441	1416	1314
% Dimere	24	21	23	22	26	23	21

Quervernetzung der Ligninbausteine

Die Gesamtausbeute der fünf mengenmäßig bedeutsamsten dimeren Reaktionsprodukte betrug in Nadeln 352 ± 50 μmol pro Gramm Lignin und in Hypocotylen 254 ± 40 μmol pro Gramm Lignin. Dies entspricht 20-28 % (Nadeln) bzw. 21-26 % (Hypocotyle) von der Ausbeute des monomeren Guajacyl-Hauptproduktes 1. Der Dimer-Anteil war damit ähnlich wie in SWL (25 %; Tab. 24.). Im Vergleich mit SWL wurde in sämtlichen Keimlingsproben ein geringerer Gehalt an Dimeren, die aus 5-5- (26-28 %) und 8-1-Einheiten (24-28 %) gebildet wurden, festgestellt (SWL: 33 % 5-5-, 28 % 8-1-Einheiten). Die Ausbeute von Abbauprodukten aus 8-5-Struktureinheiten lag dagegen über dem Wert für SWL (40-43 % gegenüber 30 %). Produkte aus 8-8- und 4-O-5-Bindungen kamen bei Fichtenkeimlingen und SWL mit einem ähnlichen relativen Anteil vor (8-8: Spuren, 4-O-5: 5-7 %). Neben diesen Abbauprodukten wurden in Hypocotylen sehr geringe Mengen unsymmetrischer *p*-Hydroxyphenyl-Guajacyl-Dimere nachgewiesen (Summe weniger als 3 % des Guajacyl-Monomers 1).

Tab. 24. Analyse der dimeren Produkte nach Thioacidolyse und Desulfurierung aus (A) Nadeln und (B) Hypocotylen von Fichtenkeimlingen. Angegeben sind Mittelwerte aus jeweils zwei Thioacidolysen.

A

Dimer Bindungstyp	Kontrolle			300 nl l ⁻¹		600 nl l ⁻¹	
	Tag 0 [Rel.Mol%]	Tag 7 [Rel.Mol%]	Tag 27 [Rel.Mol%]	Tag 7 [Rel.Mol%]	Tag 27 [Rel.Mol%]	Tag 7 [Rel.Mol%]	Tag 27 [Rel.Mol%]
7+ 8 (5-5)	28	27	27	26	27	28	28
9+10 (8-5)	42	40	42	42	42	43	40
11+12 (8-8)	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
13 (8-1)	24	28	26	26	25	22	27
14 (4-O-5)	6	5	5	5	6	7	5

Fortsetzung Tab. 24, Thioacidolyse-Dimere der Hypokotyle von Fichten-Keimlingen.

B

Dimer Bindungstyp	Kontrolle			300 nl l ⁻¹		600 nl l ⁻¹	
	Tag 0 [Rel.Mol%]	Tag 7 [Rel.Mol%]	Tag 27 [Rel.Mol%]	Tag 7 [Rel.Mol%]	Tag 27 [Rel.Mol%]	Tag 7 [Rel.Mol%]	Tag 27 [Rel.Mol%]
7+ 8 (5-5)	28	28	27	27	29	26	27
9+10 (8-5)	40	41	41	43	41	42	41
11+12 (8-8)	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
13 (8-1)	25	24	26	24	24	27	26
14 (4-O-5)	7	7	6	6	6	5	6

Die Ozonbehandlung führte weder bei einer Konzentration von 300 nl l⁻¹ noch bei 600 nl l⁻¹ zu einer deutlichen Veränderung der Ausbeute monomerer und dimerer Thioacidolyseprodukte in Nadeln und Hypokotylen von Fichtenkeimlingen gegenüber den in Reinluft kultivierten Kontrollkeimlingen, noch zeigten sich Veränderungen in der Zusammensetzung aus den unterschiedlichen quervernetzenden Bindungstypen. Auch wenn die Gesamtausbeute der Thioacidolyse-Produkte auf die eingesetzte Menge Zellwand bezogen wurde, konnten keine meßbaren Unterschiede im Ligningehalt der Kontroll- und der Ozonbehandelten Keimlinge festgestellt werden. Die Streuung der bei den verschiedenen Erntezeitpunkten erhaltenen Werte für den Gehalt mono- und dimerer Thioacidolyse-Produkte lag bei 8-10 %. Der Ligningehalt der Keimlinge erhöhte sich nach Maßgabe der LTGA-Methode durch die Ozonbehandlung um 10-15 % gegenüber den Kontrollkeimlingen. Möglicherweise war die mit der LTGA-Methode nachgewiesene Ozon-induzierte Änderung im Ligningehalt wegen der Streuung der Werte bei der Thioacidolyse nicht nachweisbar. Der Gehalt an *p*-Hydroxyphenyl-Einheiten (3), der auf die Verwendung von *p*-Cumarylalkohol als Monolignol zurückgeht, war mit 8-9 % des Guajacylmonomers 1 im Vergleich mit Holzlignin der Fichte (1 %) recht hoch und wurde durch die Ozon-Behandlung nicht weiter gesteigert.

2.3 Ozoneffekt auf die Aktivitäten von Enzymen der Ligninbiosynthese

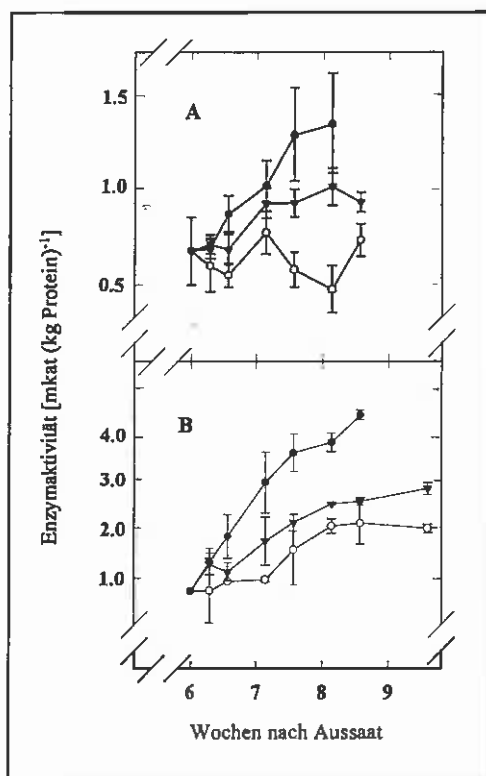
Zimtalkoholdehydrogenase (CAD)

Drei Tage nach Beginn der Ozonbehandlung (300 nl l⁻¹ und 600 nl l⁻¹ Ozon) waren deutliche Steigerungen der Enzymaktivität von CAD in Nadeln und Hypokotylen von Fichtenkeimlingen gegenüber den in Reinluft kultivierten Kontrollkeimlingen zu beobachten (Abb. 53 A,B). Nach 14 Tagen erreichten die CAD-Aktivitäten in Nadeln nach jeweils annähernd linearem Anstieg Werte von 0.70 ± 0.10 (Kontrollen), 1.02 ± 0.01 (300 nl l⁻¹ Ozon) und 1.30 ± 0.22 (600 nl l⁻¹ Ozon) mkat·(kg protein)⁻¹. In Hypokotylen wurden zum gleichen Zeitpunkt 2.02 ± 0.09 (Kontrollen), 2.37 ± 0.03 (300 nl l⁻¹ Ozon) und 3.77

± 0.02 ($600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ Ozon) $\text{mkat} \cdot (\text{kg protein})^{-1}$ gemessen. Die CAD-Aktivität war demnach in Hypokotylen um den Faktor 1.5-2 höher als in den Nadeln.

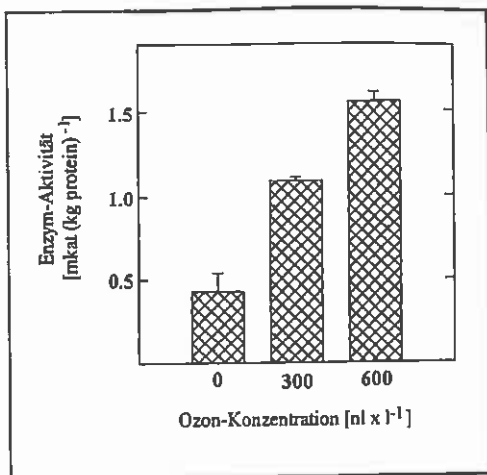
Abb. 53. Ozon-Effekt auf die Aktivität der Zimtaklohol-Dehydrogenase (CAD) in Nadeln (A) und Hypokotylen (B) von Fichten-Keimlingen (Dreifachbestimmung von Mischproben $\pm$ SA). Symbole:

- Kontrolle;
- ▼ $300 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ Ozon;
- $600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ Ozon.



Der Effekt von erhöhten Ozonkonzentrationen auf die CAD-Aktivität in Hypocotylen und Nadeln spiegelte sich in einer signifikanten Dosis-Wirkungs-Beziehung wieder (Abb. 54). Nach dem Kruskal-Wallis-Test (Statgraphics STN, St. Louis, USA; Vergleich der CAD-Aktivität in Nadeln 15 Tage nach Beginn der Ozon-Behandlung) war ein hohes Signifikanzniveau sowohl für den Vergleich der CAD-Aktivität von Kontrollen und Ozon-behandelten Keimlingen ($P \leq 0.005$ für Behandlung mit $300 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ und $600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ Ozon), als auch für die Differenz der Aktivität bei den zwei Ozon-Behandlungsvarianten ($300 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ und $600 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ Ozon; $P \leq 0.005$) gegeben.

Abb. 54. Dosis-Wirkungs-Effekt von Ozon auf die Enzymaktivität von CAD in Nadeln von Fichtenkeimlingen (angegeben ist der Mittelwert ($n=5$) $\pm$ SA).



Peroxidase (POD)

Der Verlauf der Gesamt-POD-Aktivität zeigte sowohl in Kontroll- als auch Ozon-behandelten Fichtenkeimlingen eine ähnliche Charakteristik wie die Entwicklung der CAD-Aktivität (Abb. 55). Die POD-Aktivität erreichte 18 Tage nach Beginn des Experiments Werte von 0.85 ± 0.15 (Kontrollen), 1.67 ± 0.41 (300 nl·l⁻¹ Ozon) und 1.92 ± 0.72 (600 nl·l⁻¹ Ozon) ΔE_{420} (min · g Frischgewicht)⁻¹ in den Nadeln. In Hypokotylen wurden zum gleichen Zeitpunkt 1.22 ± 0.28 (Kontrollen), 1.84 ± 0.32 (300 nl·l⁻¹ Ozon) und 2.22 ± 0.45 (600 nl·l⁻¹ Ozon) ΔE_{420} (min · g Frischgewicht)⁻¹ ermittelt. Die POD-Aktivität in Nadeln von Fichtenkeimlingen wies unter dem Einfluß erhöhter Ozonkonzentrationen einen signifikant gesteigerten Wert auf. Nach Maßgabe des Kruskal-Wallis-Tests (Statgraphics STN, St. Louis, USA; Vergleich der POD-Aktivität in Nadeln 15 Tage nach Beginn der Ozon-Behandlung) wurde ein hohes Signifikanzniveau für den Vergleich der CAD-Aktivität von Kontrollen und Ozon-behandelten Keimlingen ($P \leq 0.005$ für Behandlung mit 300 nl·l⁻¹ und 600 nl·l⁻¹ Ozon) erhalten (Abb. 56). Die Differenz der Aktivität bei den zwei Ozon-Behandlungsvarianten (300 nl·l⁻¹ und 600 nl·l⁻¹ Ozon) war nicht signifikant.

Abb. 55. Ozon-Effekt auf die Aktivität der Gesamt-Peroxidasen (PODs) in (A) Nadeln und (B) Hypokotylen von Fichten-Keimlingen (Dreifachbestimmung von Mischproben $\pm$ SA). Symbole:
 ○ Kontrolle;
 ▼ 300nl-l⁻¹ Ozon;
 ● 600nl-l⁻¹ Ozon.

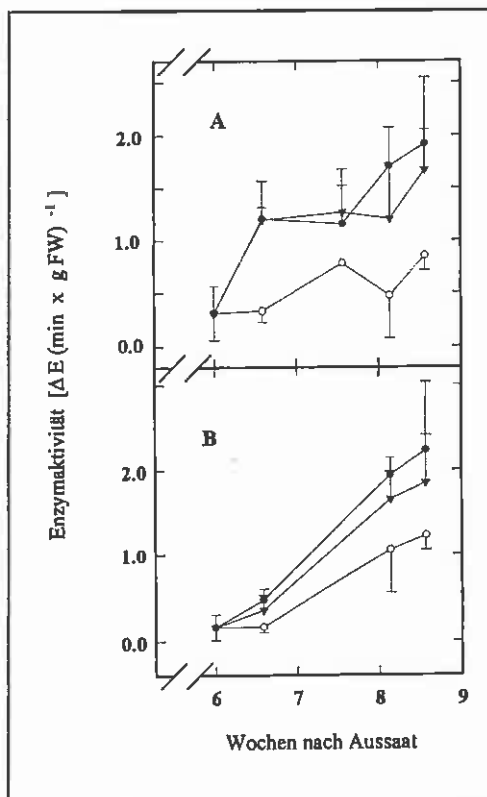
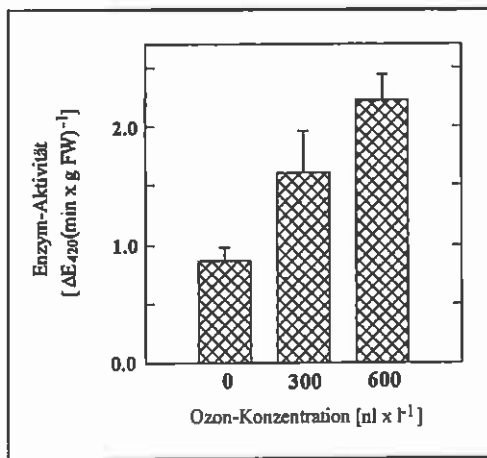


Abb. 56. Dosis-Wirkungs-Effekt von Ozon auf die Enzymaktivität von Gesamt-PODs in Nadeln von Fichtenkeimlingen (angegeben ist der Mittelwert (n=5) $\pm$ SA).



3. Untersuchungen zum Bindungstyp von Anilinen in Dehydrierungs-polymerisaten (DHPs)

3.1 Synthese und Charakterisierung der DHPs

Es ist seit längerem bekannt, daß 3,4-Dichloranilin (DCA), ein wichtiges Stoffwechselintermediat des Metabolismus' verschiedener bedeutender Herbizide in Pflanzen, zu wesentlichen Teilen in die Zellwände eingelagert wird und so zur Bildung sogenannter „nicht-extrahierbarer Rückstände“ führt. Als eine Haupt-Anlagerungsstelle für DCA in diesen Rückständen wurden wiederholt Lignine nachgewiesen (Yih et al. 1968; Sutherland 1976; Still et al. 1981; Langebartels und Harms 1988; Pogany et al. 1990; Sandermann et al. 1992). Die Kenntnis des Bindungstyps von DCA in Lignin-artigen Polymeren ist ein wichtiger Schritt bei der Bewertung der toxikologischen Relevanz dieser Fremdstoff-Rückstände in Nahrungspflanzen. Zur Charakterisierung der chemischen Umgebung von DCA in Ligninen wurden in der vorliegenden Arbeit Dehydrierungspolymerisate als Modellpolymere eingesetzt. Zunächst wurde als Referenz ein solches *in vitro*-Polymer (Ref-DHP; Zulaufverfahren) in leichter Abwandlung nach Freudenberg (1968) aus Coniferylalkohol unter Zugabe von H_2O_2 und Katalyse durch Meerrettich-Peroxidase synthetisiert. Nach verschiedenen Waschschritten wurde das Polymer gefriergetrocknet (Lycovac GT 2, Leybold-Hereaus, Köln). Nach dem gleichen Verfahren wurden Copolymerisate mit äquimolaren Mengen von Coniferylalkohol und 3,4-Dichloranilin (DCA-DHP), sowie [^{15}N] Anilin (Ani-DHP) als Struktur-Analogon von DCA hergestellt. Zusätzlich wurde noch eine DHP-Synthese mit [U-Ring- ^{14}C] 3,4-Dichloranilin als Cosubstrat durchgeführt ([^{14}C] DCA-DHP). Von der während der Aufarbeitung des polymeren Syntheseproduktes wiedergefundenen Radioaktivität aus [^{14}C] DCA wurden 40 % im Polymer und 60 % in den Reinigungsfractionen detektiert. Die Einbaurate von DCA in [^{14}C] DCA-DHP betrug demnach 40 %. Daraus resultiert ein molares Verhältnis von Coniferylalkohol/DCA im Polymer von 2.5 : 1. Die Ausbeuten der Polymersynthesen betrugen 95 % (Ref-DHP), 59 % (DCA-DHP), 63 % (Ani-DHP) und 55 % ([^{14}C] DCA-DHP).

3.1.1 Molekulargewichtsverteilung

Von allen vier Polymeren wurde die Molekulargewichtsverteilung mittels Gelpermeationschromatographie (HPSEC) bestimmt (Abb. 57, 58). Dafür wurde eine Kombination zweier Säulen unterschiedlicher Porenweite mit Dimethylformamid als Laufmittel verwendet (Details s. II 10.6). Von [^{14}C] DCA-DHP wurde mittels HPSEC ein breiter Peak im Bereich von 16-21 min erhalten (Abb. 57 A). Die inkorporierte Radioaktivität wies ein exakt gleiches Elutionsprofil auf (Abb. 57 B). Damit konnte ausgeschlossen werden, daß nicht-kovalente niedermolekulare Einschlüsse von DCA im Polymer vorkommen. Nach Umrechnung der Retentionszeiten in die entsprechenden Molekulargewichte wurde eine für Polymere typische

polydisperse Molekulargewichtsverteilung mit einem Maximum bei ca. 11,0 kDa ermittelt (Abb. 57 C).

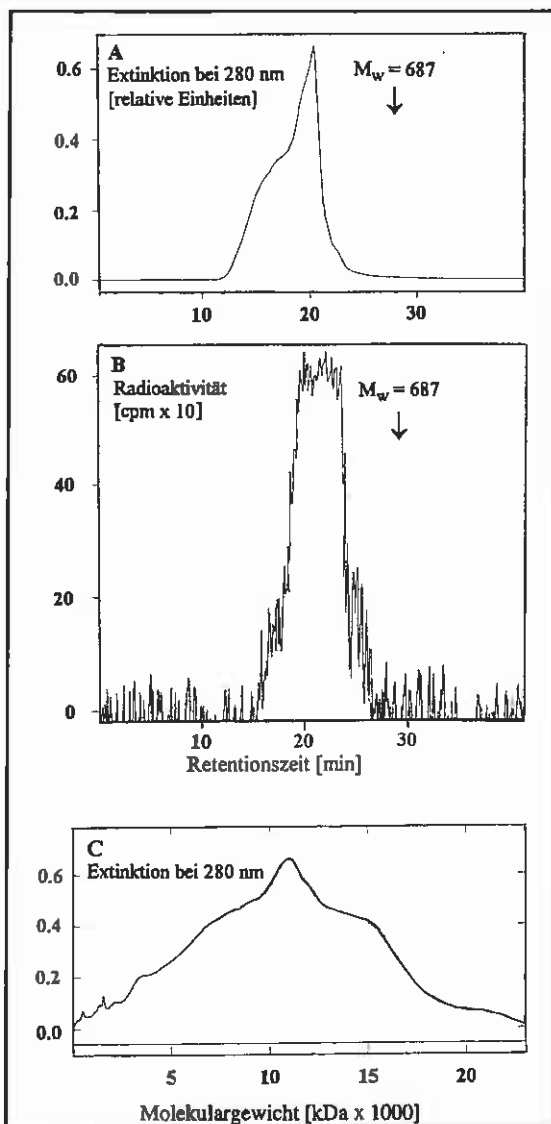
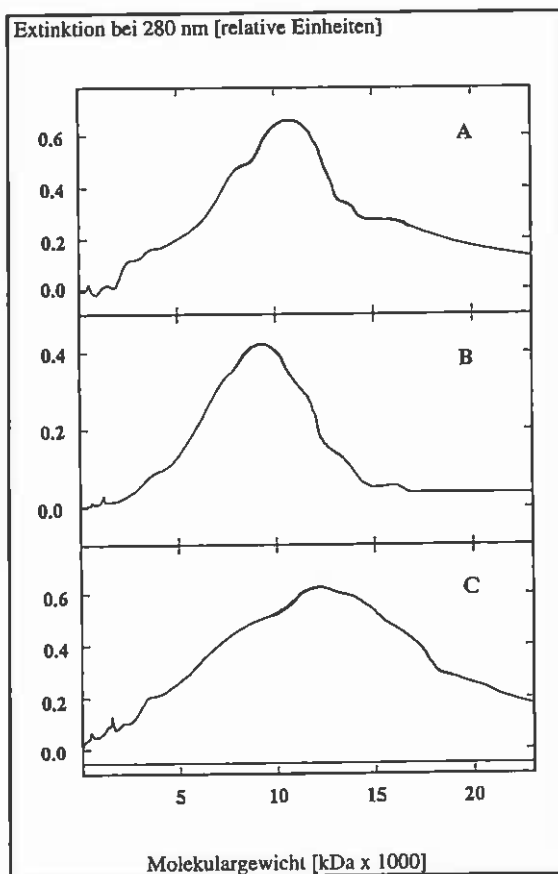


Abb. 57. Molekulargewichtsverteilung eines Dehydrationspolymerisates aus Coniferylalkohol und [U-Ring- ^{14}C] 3,4-Dichloranilin, bestimmt mittels HPSEC (Details siehe Text; Elutionsprofil mit (A) Detektion bei 280 nm, (B) Detektion der Radioaktivität; (C), Molekulargewichtsverteilung, Detektion bei 280 nm)

Die Molekulargewichtsverteilung der weiteren DHPs war jener von [^{14}C] DCA-DHP sehr ähnlich. Die Maxima lagen bei 11.7 kDa (Ref-DHP), 9.9 kDa (DCA-DHP) und 10.2 kDa (Ani-DHP).

Abb. 58. Molekulargewichtsverteilung verschiedener Dehydrierungspolymerisate (DHPs), bestimmt mittels HPSEC (Details siehe Text, Detektion bei 280 nm); (A) DHP aus Coniferylalkohol, (B) DHP aus Coniferylalkohol und 3,4-Dichloranilin, (C) DHP aus Coniferylalkohol und [^{15}N] Anilin.



3.1.2 Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie

^1H -NMR-Spektroskopie

Von den Polymerisaten Ref-DHP, DCA-DHP und Ani-DHP wurden NMR-Spektren mit Hilfe unterschiedlicher Methoden aufgenommen und miteinander verglichen. In Abb. 59 sind die ^1H -NMR-Spektren der DHPs gezeigt.

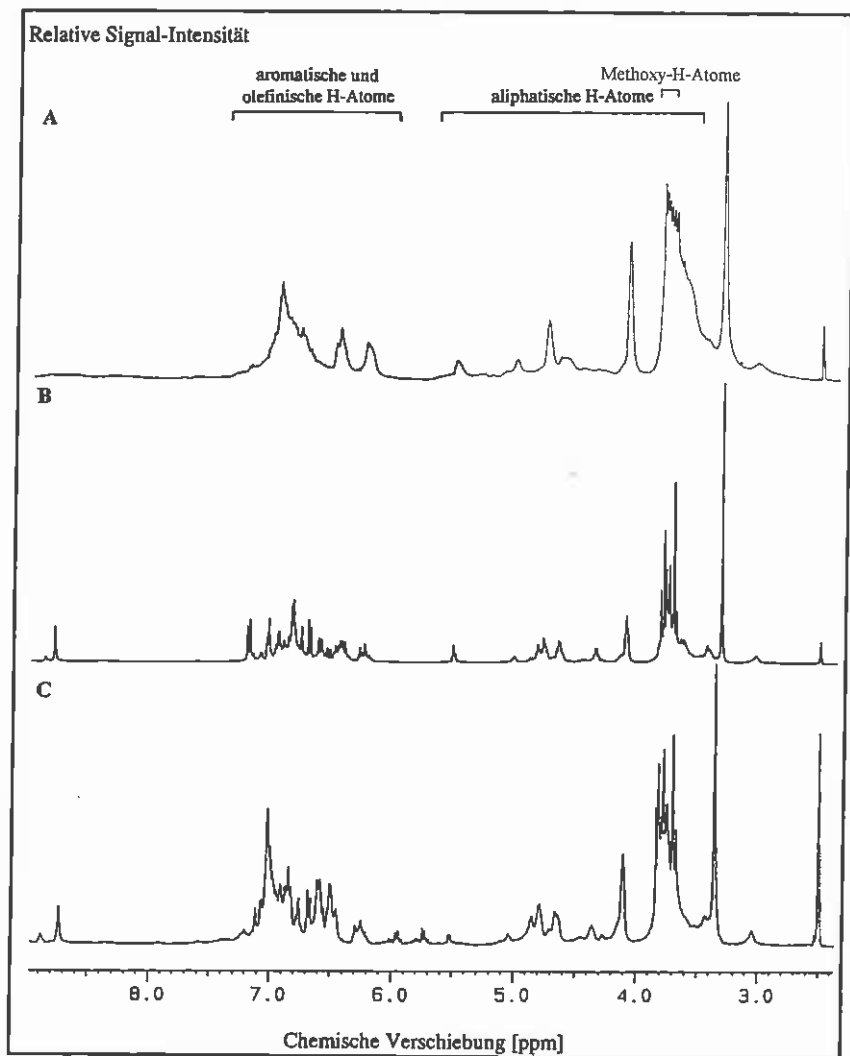


Abb. 59. ^1H -NMR-Spektren von (A) DHP aus Coniferylalkohol, (B) DHP aus Coniferylalkohol und 3,4-Dichloranilin, (C) DHP aus Coniferylalkohol und ^{15}N Anilin in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K. Die Bereiche der chemischen Verschiebung für aromatische, aliphatische und Methoxy-H-Atome sind oberhalb der Spektren eingezeichnet.

Für Ref-DHP konnte die Zuordnung einiger Signale anhand von Literaturdaten (Ludwig 1971; Lundquist 1980) vorgenommen werden. Das Signal bei 2.49 ppm wurde durch das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid, jenes bei 3.30 ppm durch den internen Standard Methanol

hervorgerufen. Zwischen 3.61 und 3.80 ppm befand sich ein schlecht aufgelöstes Multiplett, dem aliphatische H- γ -Atome und H-Atome aromatischer Methoxygruppen (3.70-3.80 ppm) zuzuordnen sind. Die weiteren aliphatischen H-Atome waren H- γ in olefinischen Seitenketten (4.15 ppm), H- β in β -O-4-Bindungen (4.35 ppm), H- α und H- β in verschiedenen Bindungstypen (4.60 ppm), H- α in β -O-4-Struktureinheiten (4.70 ppm), H- α in verschiedenen Bindungstypen (5.0 ppm) und H- α in β -5-Strukturen (5.48 ppm). Im Tieffeldbereich des Spektrums waren drei Signalgruppen bei 6.20 ppm (H- β in olefinischen Seitenketten), 6.46 ppm (H- α in Coniferyl-alkohol-Endgruppen) und ein nicht aufgelöster Bereich von 6.80-7.10 ppm (aromatische H-Atome und Vinyl-H-Atome in Coniferylaldehyd-Seitenketten) zu erkennen. Durch den Einbau der Xenobiotika in DHPs wurde das Spektrum deutlich verändert. Neben einer erhöhten Linienzahl in DCA-DHP und Ani-DHP wurde gegenüber Ref-DHP auch eine verbesserte Auflösung der Resonanzen beobachtet. In DCA-DHP traten zusätzlich zu den in Ref-DHP detektierten noch einige weitere Signale bei 4.32, 4.63, 4.80, 6.65 und 7.20 ppm auf, wobei zusätzliche Veränderungen im Verschiebungsbereich der aromatischen H-Atome infolge der mangelhaften Auflösung in Ref-DHP nicht zuzuordnen waren. In Ani-DHP wurden bei 4.40, 4.65, und 6.60 ppm zusätzliche Signale detektiert, die in Ref-DHP fehlten. Das Verhältnis aromatisch/olefinischer (6.0-7.3 ppm) zu aliphatischen und Methoxy-H-Atomen (3.4-5.9 ppm) wurde durch Integration quantifiziert. Die errechneten Werte betrugen für Ref-DHP 0.43 (3 aromatische, 7 aliphatische H-Atome), für DCA-DHP (bei einer theoretischen Einbaurrate von 100 %, also einem molaren Verhältnis von Coniferylalkohol/DCA von 1 : 1) 0.86 (6 / 7) und für Ani-DHP (Einbaurrate 100 %, molares Verhältnis Coniferylalkohol/[^{15}N] Anilin 1 : 1) 1.14 (8 / 7). Die nach der oben genannten Methode gemessenen Werte waren 0.45 (Ref-DHP), 0.71 (DCA-DHP) und 0.86 (Ani-DHP). Damit lassen sich die Einbauraten von DCA in DCA-DHP und [^{15}N] Anilin in Ani-DHP grob mit 60 % annähern. Dieser Wert liegt deutlich höher als jener, der unabhängig davon durch Quantifizierung der inkorporierten Radioaktivität (ca. 40 %) in [^{14}C] DCA-DHP bestimmt wurde. Die maximale theoretische Einbaurrate beträgt 50 % (molares Verhältnis Coniferylalkohol/DCA 2 : 1). Der relative Anteil von Signalen, die auf das Vorkommen von H-Atomen olefinischer Seitenketten zurückzuführen waren (4.15 (H- γ), 6.20 (H- β), 6.46 (H- α) ppm), war in DCA-DHP und Ani-DHP gegenüber Ref-DHP um 30-50 % reduziert (Abschätzung aus den Integralen der entsprechenden Signale).

^{13}C -NMR-Spektroskopie

Als weitere Methode zur Charakterisierung der Bindung von DCA und [^{15}N] Anilin an Ligninkomponenten wurde die ^{13}C -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Die entsprechenden Spektren für Ref-DHP, DCA-DHP und Ani-DHP sind in Abb. 60 gezeigt. Im Vergleich mit Ref-DHP erscheinen in DCA-DHP zwei zusätzliche Signale im aliphatischen Verschiebungsbereich (56.7 und 84.1 ppm) und mindestens 10 neue Signale im Bereich der aromatischen C-Atome (111.6, 113.3, 114.0, 116.5, 116.8, 119.7, 130.9, 131.0, 145.5 und 148.2 ppm). In Ani-

DHP wurden zwei neue aliphatische ^{13}C -Signale (56.7 (Dublett) und 84.3 ppm) und mindestens 10 zusätzliche Signale von aromatischen C-Atomen (111.6, 113.1, 116.0, 116.8-117.1, 119.7, 131.1, 132.0, 145.4 und 147.9 ppm (Dublett)) nachgewiesen.

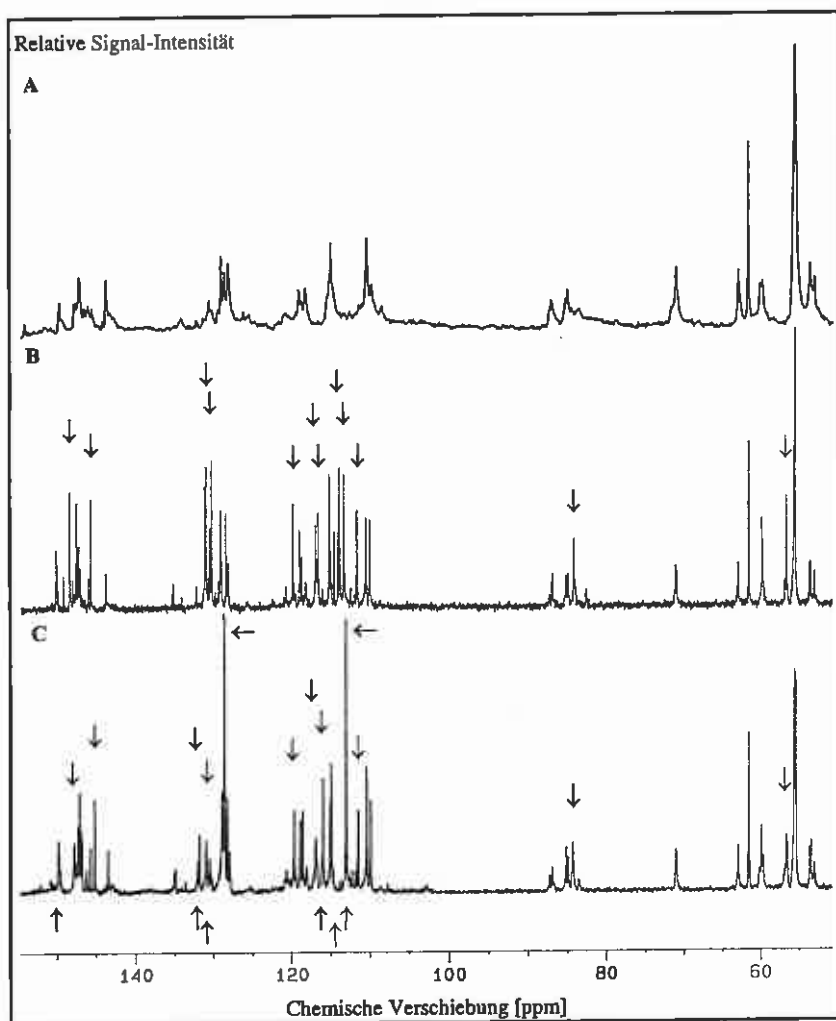


Abb. 60. ^{13}C -NMR-Spektren von (A) DHP aus Coniferylalkohol, (B) DHP aus Coniferylalkohol und 3,4-Dichloranilin, (C) DHP aus Coniferylalkohol und $[^{15}\text{N}]$ Anilin in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K. Der Numerierung von Signalen in (A) entsprechen die in Tab. 25 aufgelisteten Zuordnungen. Kennzeichnung der in (B) und (C) gegenüber (A) neu auftretenden Signale mit ↓ und ←. Chemische Verschiebungswerte der DCA-H-Atome sind mit ↑ angezeigt.

Die Literaturdaten für die Zuordnung der in Ligninen auftretenden ^{13}C -Signale wurden durch umfassende Arbeiten mit Modellsubstanzen wiederholt belegt (Lapierre et al. 1987; Robert 1993). Durch Vergleich des Spektrums von Ref-DHP mit diesen Referenzen wurden die in Tab. 25 zusammengefaßten Zuordnungen getroffen.

Tab. 25. Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale eines Dehydrierungspolymerisats (Ref-DHP; *d*₆-Dimethylsulfoxid, 303 K).

Signalnummer	Zuordnung	δ [ppm] (Literatur)	δ [ppm] (Ref-DHP)
1	Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)	39.5	39.5
2	C-8 in β -5-Struktureinheiten	52.8-53.5	53.0
3	C-8 in β -8-Struktureinheiten	53.4-54.0	53.6
4	Aromatische OCH_3 -Gruppen	55.7-55.9	55.7
5	C- γ in β -O-4-Struktureinheiten	59.8-61.7	61.6
6	C- γ in β -5-, β -O-4 (mit α -C=O)-Struktureinheiten, C- γ in Coniferylalkohol-Seitenketten	61.9-63.8	62.9
7	C- γ in β -8- und Dibenzyltetrahydrofuran- Struktureinheiten	70.7-71.5	70.9
8	C- α in β -O-4-Struktureinheiten	71.5-72.5	71.2
9	C- β in β -O-4-, C- α in β -8-Struktureinheiten	83.5-86.0	84.9
10	C- α in β -5-Struktureinheiten	86.8-87.1	86.9
11	C-2 in Guajacyleinheiten	110.4-111.6	110.4
12	C-5 in Guajacyleinheiten	114.9-115.7	114.9; 115.1
13	C-6 in Guajacyleinheiten	117.4-120.3	118.1-119.0
14	C- α und C- β in Coniferylalkohol-Seitenketten	128.0-129.3	128.0-129.4
15	C-1 in β -5-Struktureinheiten, C-1 in Coniferylalkohol-Seitenketten	129.5-130.5	130.2; 130.5
16	C-1 in Guajacyleinheiten	133.6-135.3	134.0
17	C-4 in 5-5- und Guajacyl (phenolisch)- Struktureinheiten	143.4-145.3	143.6
18	C-3 (phenolisch) und C-4 in Guajacyl- Struktureinheiten	146.9-148.1	147.0-147.6
19	C-3 in Guajacyl-Struktureinheiten	149.1-150.7	149.7

Die DEPT-Pulssequenz

Zur Unterscheidung der ^{13}C -Signale von CH_3 -, CH_2 -, CH -Gruppen und quartären C-Atomen kann das *J*-modulierte Spinecho- oder auch **DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)-Experiment** dienen (Doddrell et al. 1982). Die DEPT-Pulssequenz bewirkt neben einer Empfindlichkeitssteigerung durch Polarisationstransfer eine Editierung von ^{13}C -Signalen nach ihrer Multiplizität, d.h. nach der Anzahl direkt gebundener H-Atome. Je nach Pulslänge des „Read-Pulses“ (letzter Puls einer Pulssequenz) werden sogenannte DEPT-45-, -90- und -135-Spektren unterschieden. Davon kamen in der vorliegenden Arbeit DEPT-90 und DEPT-135 zum Einsatz. DEPT-90-Spektren zeigen ausschließlich Methin-C-Atome. In der

DEPT-135-Version erscheinen diese wie Methylgruppen in positiver, die Methylengruppen dagegen in negativer Phase. In Abb. 61 sind zwei DEPT-NMR-Spektren von DCA-DHP gezeigt. Durch Verwendung der DEPT-Pulssequenz konnten die in Tab. 25 getroffenen Zuordnungen für die in Ref-DHP auftretenden ^{13}C -Signale noch zusätzlich untermauert werden: 55.7 ppm (CH_3 -Gruppen in OCH_3), 60.1, 61.6, 62.9, 70.9 ppm (CH_2 -Gruppen von C- γ in verschiedenen Bindungstypen), 53.0, 53.6 ppm (CH-Gruppen von C- β in β -5- und β - β -Strukturen), 84.9 ppm (CH-Gruppen von C- β in β -O-4 und C- α in β - β -Strukturen), 86.9 ppm (CH-Gruppen von C- α in β -5-Strukturen), 110.0-129.5 ppm (aromatische CH-Gruppen von C-2, C-5, C-6 (alle Guajacyl)), 129.5-150.0 ppm (quartäre C-Atome von C-1, C-3, C-4 in Guajacyl-Aromaten). Die in DCA-DHP gegenüber Ref-DHP zusätzlich auftretenden Signale wiesen die folgenden Multiplizitäten auf: 56.7 und 84.1 ppm (aliphatische CH-Gruppen), 111-120 ppm (aromatische CH-Gruppen), 131-148 ppm (quartäre C-Atome).

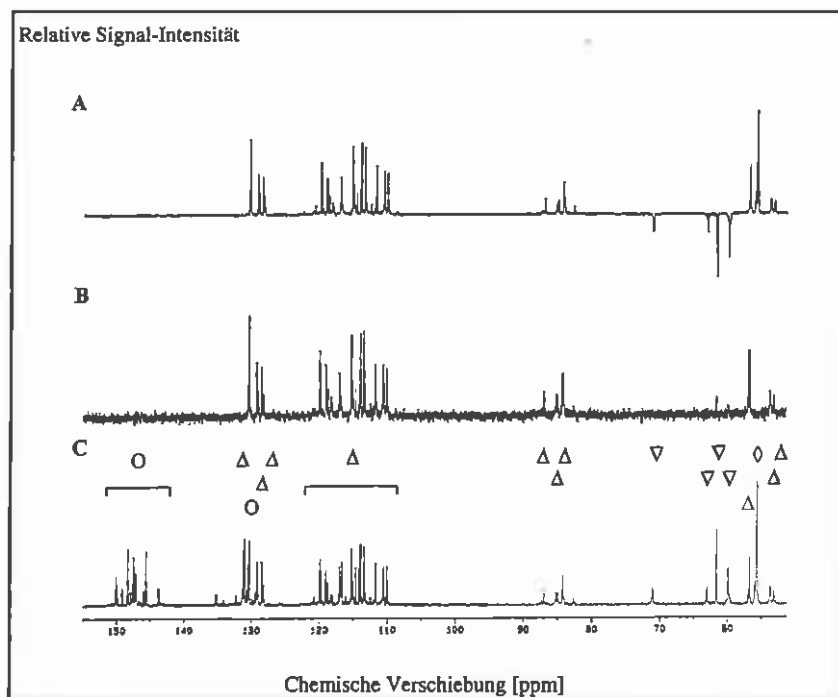


Abb. 61. DEPT- ^{13}C -NMR-Spektren von einem Dehydrierungspolymerisat aus Coniferylalkohol und 3,4-Dichloroanilin; (A) DEPT-90, (B) DEPT-135, (C) übliches ^{13}C -NMR-Spektrum in *d*₆-Dimethylsulfoxid. Kennzeichnungen: O (quartäre C-Atome), Δ (Methin-C-Atome), ▽ (Methylen-C-Atome), ◇ Methoxyl-C-Atome (Details siehe Text).

^{15}N -NMR-Spektroskopie

Als eine weitere Methode zur Charakterisierung der chemischen Umgebung des Anilin-Stickstoffs in Ani-DHP wurde die ^{15}N -NMR-Spektroskopie genutzt. Da aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit des Isotops ^{15}N (0.4 % gegenüber 99.6 % ^{14}N), sowie dessen niedrigen gyromagnetischen Verhältnisses die NMR-Empfangbarkeit von ^{15}N sehr gering ist (1.04×10^{-3} bezogen auf $^1\text{H} = 1$), wurde für die ^{15}N -NMR-Untersuchungen von Ani-DHP Isotopen-angereichertes Anilin (98 % ^{15}N) eingesetzt. Mit Hilfe spezieller Methoden, z.B. der INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer)-Pulsfolge, gelingt die Übertragung der Populationsdifferenz von relevanten Kernzuständen eines empfindlichen Kerns wie ^1H auf eine unempfindliche Kernsorte wie ^{15}N . Voraussetzung dafür ist eine Spin-Spin-Kopplung zwischen ^1H und ^{15}N , wobei eine Signalverstärkung um den Faktor $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}}$ (γ = gyromagnetisches Verhältnis) erreicht wird. Von den vorhandenen Proben wurden zunächst „inverse gated“ entkoppelte ^{15}N -NMR-Spektren aufgenommen. Diese wurden mit ^{15}N -INEPT-Spektren verglichen. Letztere wiesen bei verbessertem Signal/Rausch-Verhältnis die gleichen Signallagen und Integralverhältnisse auf. Deshalb konnten für eine genauere Identifizierung intensitätsschwacher Resonanzen INEPT-Spektren (entsprechend einer $^1\text{J}(\text{N-H})$ -Kopplung von 75 Hz) eingesetzt werden. Die aus den gekoppelten ^{15}N -Spektren später ermittelten $^1\text{J}(\text{N-H})$ -Werte betrugen für ^{15}N Anilin 80 Hz und in Ani-DHP 85 Hz (Abb. 62 A).

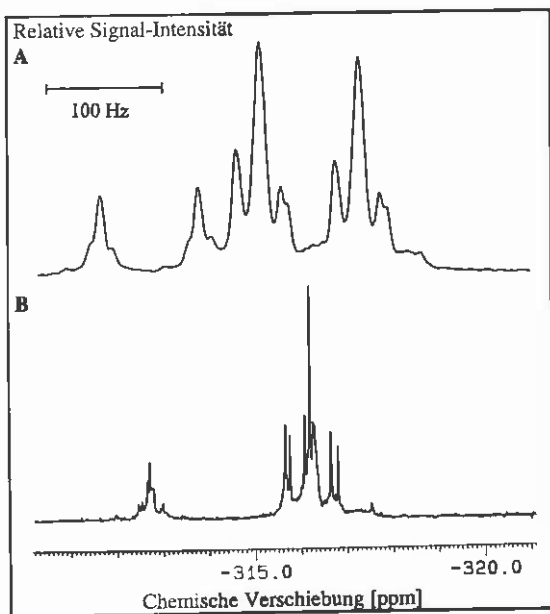


Abb. 61. ^{15}N -INEPT-Spektrum von einem Dehydrierungspolymerisat aus Coniferylalkohol und ^{15}N Anilin in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K (A: ^1H -gekoppeltes. B: ^1H -entkoppeltes Spektrum).

Fernkopplungen wurden dabei nicht aufgelöst. Wie in (Abb. 62 B) gezeigt, traten in den ^1H -entkoppelten ^{15}N -Spektren zwei unterschiedliche Signalgruppen bei -313.5 bis -314.2 ppm und bei -316.7 bis -317.8 ppm auf. Die Aufspaltung beider Signalgruppen in Dubletts im ^1H -gekoppelten Spektrum (Abb. 62 A) zeigt, daß am Anilin-Stickstoff in beiden Fällen genau ein weiteres Proton direkt gebunden ist. Zusätzlich wurde ein zweidimensionales ^1H - ^{15}N -Shift-Korrelationsspektrum oder auch COSY (Correlated Spectroscopy) aufgenommen. Auf beiden Achsen eines solchen COSYs sind chemische Verschiebungen aufgetragen und man erhält ein Konturdiagramm, bei dem direkt miteinander koppelnde Kerne ein Kreuzsignal ergeben. Demnach ergaben sich für Ani-DHP die folgenden ^1J (H-N)-Konnektivitäten: -313.7 zu 5.90 ppm, -316.7 zu 5.81 ppm, -317.2 zu 5.83 ppm und -317.7 zu 5.87 ppm. Um die H-N-Kopplungen über zwei und mehr Bindungen nachweisen zu können, wurde auf das COLOC (Correlation via Long Range Couplings)-Experiment, ein spezielles Verfahren der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie, zurückgegriffen (Abb. 63).

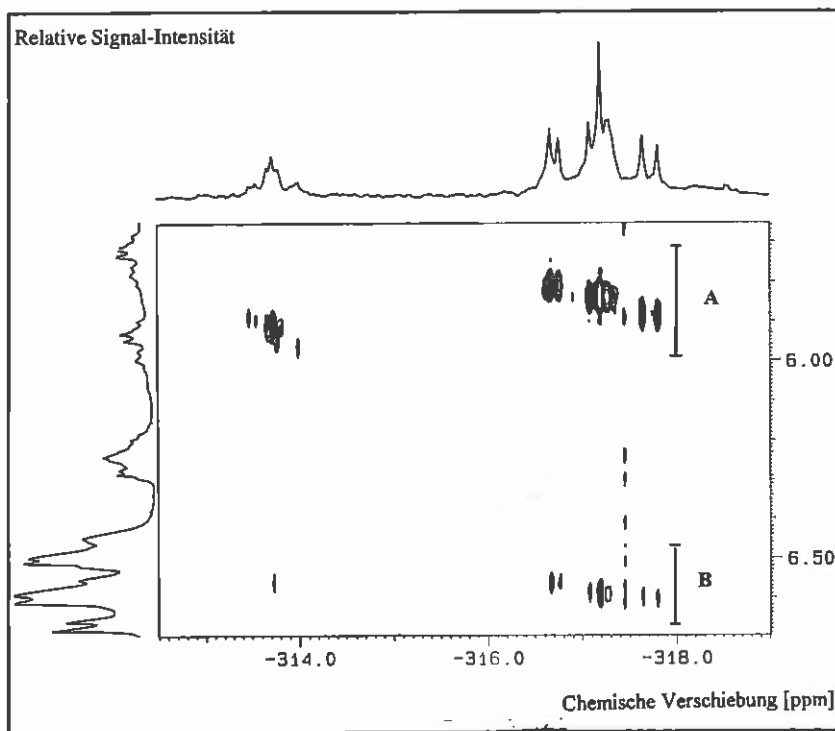


Abb. 63. ^1H - ^{15}N -COLOC-NMR-Spektrum eines Dehydrationspolymerisates aus Coniferylalkohol und ^{15}N -Anilin in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K (Bereich A: Restkopplungen von ^1J (H-N), Bereich B: ^3J (H-N)-Kopplungen).

Die folgenden vicinalen N-H-Konnektivitäten wurden detektiert: -313.7 zu 6.57 ppm, -316.7 zu 6.60 ppm, -317.2 zu 6.60 ppm und -317.7 zu 6.60 ppm. Dabei blieb zunächst offen, ob diese Kreuzsignale ausschließlich auf die Kopplung des Anilin-Stickstoffs mit den H-Atomen H-2 und H-6 des Anilinringes zurückzuführen sind oder ob der Stickstoff an einen weiteren Aromaten gebunden ist, mit dessen H-Atomen er koppelt.

Um die in DCA-DHP und Ani-DHP auf den Einbau des Fremdstoffs zurückzuführenden Veränderungen in den ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Spektren den entsprechenden Bindungstypen dieser Substanzen im Polymer zuordnen zu können, wurden geeignete Modellschubstanzen für die Bindung von DCA und Anilin an Ligninkomponenten synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert. Für die Auswahl der Modellverbindungen waren die folgenden Überlegungen maßgebend: Während der Ligninbiosynthese entstehen intermediär Chinonmethide, die dem nucleophilen Stickstoff der Aniline zwei mögliche Positionen der Anlagerung anbieten (Abb. 63): C- α der aliphatischen Seitenkette (A; nachgewiesen von v.d.Trenck et al. 1981) und C-6 des Guajacylringes (B; nach Studien von Simmons et al. 1989 mit Modellschubstanzen für Humuskomponenten). Als eine dritte Variante der Bindung war die Ausbildung eines Azomethins bei der Addition des Anilin-Stickstoffs an Coniferylaldehyd-Seitenketten (C; bisher nicht publiziert) zu prüfen.

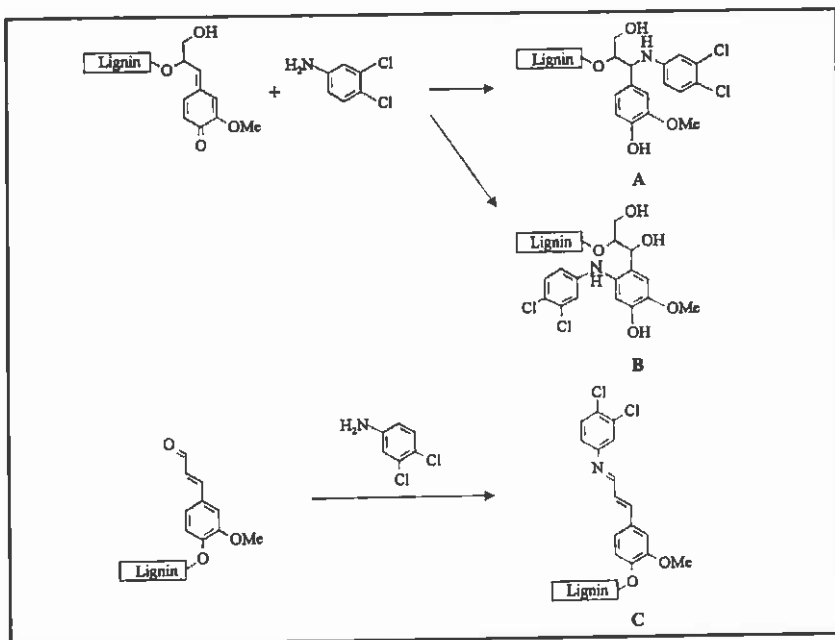


Abb. 64. Möglichkeiten der Anheftung von Anilinen an Lignin-Struktureinheiten und Mechanismus der Bindungsbildung (A, Bindung von DCA an C- α der aliphatischen Seitenkette; B, Bindung von DCA an C-6 des Guajacylringes; C, Bindung von DCA an C-1 von Coniferylaldehyd-Seitenketten).

3.2 Synthese und Charakterisierung von Modells-substanzen

3.2.1 Charakterisierung der Edukte

Erythro-Guajacylglycerol- β -guajacylether

Die Synthese von Guajacylglycerol- β -guajacylether als Modell des in Ligninen am häufigsten auftretenden Bindungstyps, der β -O-4-Bindung, wurde von W. Schäfer (1986) nach einer Vorschrift von Nakatsubo et al. (1975) durchgeführt, die stereospezifisch zum *erythro*-Isomer führt. Das Reaktionsprodukt wurde mittels präparativer HPLC (s. II 15.3) zu einem Reinheitsgrad von 96 % nach Maßgabe der Analyse mit einem Dioden-Array-Detektor aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum (Rotavapor, Büchi, Flawil, Schweiz) wurde das trockene Produkt der Reinigung in d_6 -Dimethylsulfoxid (Fluka, Neu-Ulm) gelöst und mittels verschiedener Methoden der Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie charakterisiert. In Abb. 65 ist die Struktur von Guajacylglycerol- β -guajacylether, in Abb. 66 das UV-Spektrum (Maximum bei 280 nm) und in Tab. 26 die Zuordnung der NMR-Signale zu den unterschiedlichen H-Atomen mit deren Kopplungen zu benachbarten H-Atomen gezeigt.

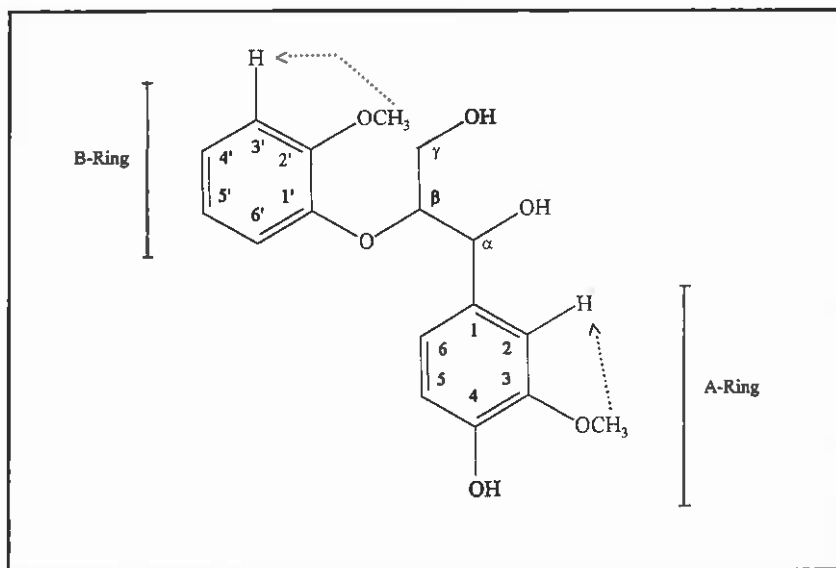


Abb. 65. Struktur von Guajacylglycerol- β -guajacylether und Bezeichnung der Strukturelemente. Zusätzlich sind NOE-Effekte bei Einstrahlung in die Resonanzfrequenz verschiedener H-Atome als gepunktete Pfeile eingezeichnet (Details siehe Text).

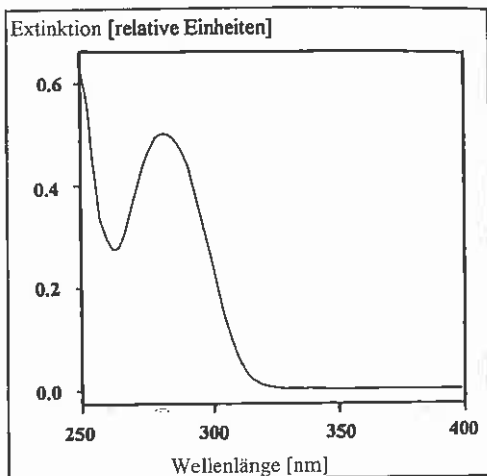


Abb. 66. UV-Spektrum von Guajacylglycerol- β -guajacyl-ether in Acetonitril

Tab. 26. ^1H -NMR-Daten von Guajacylglycerol- β -guajacylether und Zuordnung der Signale zu den entsprechenden H-Atomen (NMR-Spektrum s. Abb. 68; Details s. Text).

Zuordnung	Multiplizität	Chem. Verschiebung (ppm)	Kopplungskonstanten (J [Hz])
Seitenkette			
H- α	t	4.73	4.7 (^3J (OH- α))
H- β	t	4.31	4.7 (^3J (OH- α)); 4.7 (^3J (H- γ))
H- γ	m	3.61	11.6 (^2J (H- γ_1 /H- γ_2)); 4.7 (^3J (OH- γ)); 4.7 (^3J (H- β))
OH- α	t	5.27	4.7 (^3J (H- α)); 4.7 (^3J (H- β))
OH- γ	t	4.58	4.7 (^3J (H- γ))
A-Ring			
H-2	d	7.03	2.0 (^4J (H-6))
H-5	d	6.69	8.0 (^3J (H-6))
H-6	dd	6.79	8.0 (^3J (H-6)); 2.0 (^4J (H-6))
OCH ₃ -3	s	3.66	-
OH-4	s	8.70	-
B-Ring			
H-3'	dd	6.90	7.4 (^3J (H-4')); 2.1 (^4J (H-5'))
H-4'	td	6.84	7.4 (^3J (H-5', H-3')); 2.1 (^4J (H-6'))
H-5'	m	6.80	7.4 (^3J (H-4')); 7.5 (^3J (H-6')); 2.1 (^4J (H-3'))
H-6'	dd	6.98	7.5 (^3J (H-5')); 2.1 (^4J (H-4'))
OCH ₃ -2'	s	3.65	-

Die ^1H -NMR-Signale der H-Atome der aliphatischen Seitenkette erschienen im Verschiebungsbereich von 3.5–4.8 ppm. Der Wert der chemischen Verschiebung nahm mit zunehmendem Abstand vom aromatischen Kern (also von H- α zu H- γ) ab. Zusätzlich waren Signale der Hydroxylgruppen an C- α (5.27 ppm) und C- γ (4.58 ppm) zu sehen. Die Hydroxyl-H-Atome, die in Dimethylsulfoxid nicht austauschten, koppelten mit einer Kopplungskonstante von 4.7 Hz über drei Bindungen zu den entsprechenden aliphatischen H-Atomen. Sämtliche zwischen den aliphatischen H-Atomen auftretenden Kopplungen wurden durch das Auftreten entsprechender Kreuzsignale im ^1H - ^1H -COSY (Abb. 67) belegt und ihre Zuordnung damit gesichert.

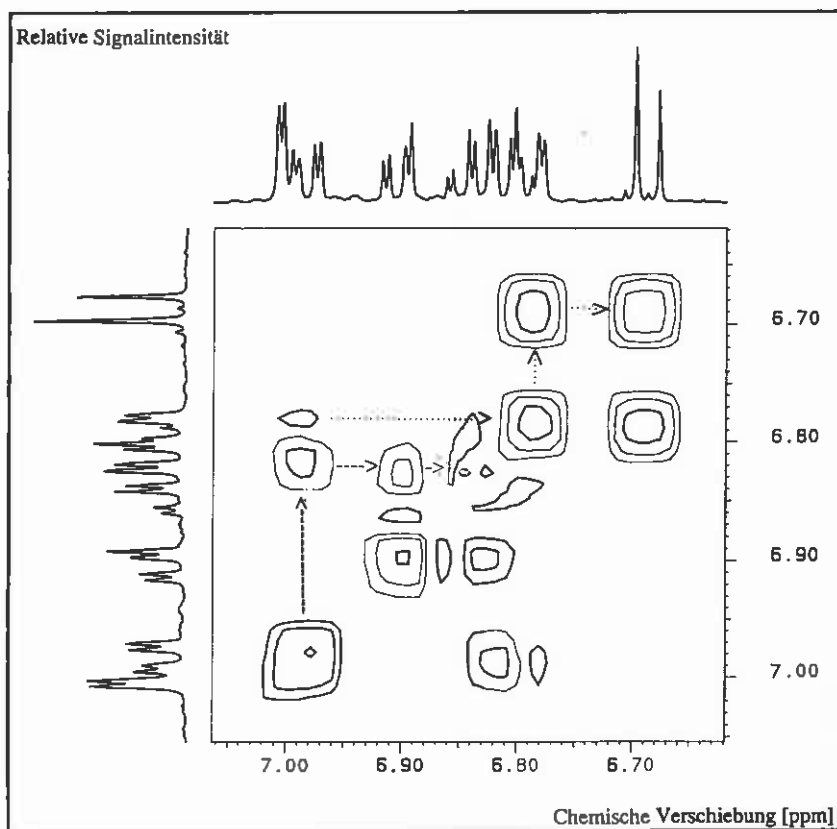


Abb. 67. ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Guajacylglycerol- β -guajacylether in d_5 -Dimethylsulfoxid bei 303 K. Kennzeichnung der Kopplungssysteme mit $\cdots$ (A-Ring), $\longrightarrow$ (B-Ring), Details s. Text.

Im Verschiebungsbereich der aromatischen H-Atome traten zwei verschiedene Mehrspinsysteme auf: ein Drei-Spin-System (AMX) im Ring A für die H-Atome H-5, H-6 und H-2 (geordnet nach steigender chemischer Verschiebung) und ein Vier-Spin-System (ABCD) für die H-Atome des B-Ringes (H-5', H-4', H-3' und H-6'). H-5 wies eine 3J -Kopplung von 8.0 Hz zu H-6 auf. H-6 koppelte neben H-5 auch mit H-2 (4J , 2.0 Hz). Etwas schwieriger gestaltete sich die Zuordnung der 1H -Signale im B-Ring. Inkrementberechnungen zum Einfluß der beiden Substituenten (+M-Effekt, Entzug von Elektronen aus dem π -Elektronensystem des Aromaten) auf die chemische Verschiebung der einzelnen H-Atome im aromatischen Kern ließen keine eindeutige Zuordnung zu. Diese gelang erst mit Hilfe von 1H , ^{13}C -COSY- und COLOC-Experimenten (Abb. 68).

Zur Festlegung der Methoxy-Substitution (3.65 und 3.66 ppm) an den aromatischen Ringen wurden NOE-Differenzspektren aufgenommen. Durch Einstrahlung in den Frequenzbereich eines Kerns erfolgt über die abstandsabhängige dipolare Kopplung ein Eingriff in die Relaxation räumlich benachbarter Kerne. Dies führt zu einer Intensitätsänderung bei den Signalen der Nachbarkerne (Kern-Overhauser-Effekt, NOE). Zunächst wurde in die Frequenz der H-Atome bei 3.66 ppm eingestrahlt. Das so erhaltene Doppelresonanz-Spektrum wurde vom ursprünglichen Spektrum subtrahiert, so daß nur jene Signale auftraten, die mit dem Kern, in dessen Frequenz eingestrahlt wurde, dipolar koppeln. Es wurde eine Kopplung mit dem H-Atom bei 7.03 ppm (H-2) nachgewiesen, diese Methoxygruppe ist also an Ring A gebunden. Bei Einstrahlung in die Frequenz der H-Atome bei 3.65 ppm wurde auf die gleiche Weise eine Kopplung zur Signalgruppe bei 6.90 ppm (H-3') gezeigt und damit die Bindung dieser Methoxylgruppe an Ring B bewiesen.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung zeigte erwartungsgemäß 17 Signale entsprechend der Anzahl der vorkommenden C-Atome (Zuordnung s. Tab. 27). Die chemische Verschiebung der C-Atome ist aus umfangreichen NMR-Experimenten bekannt (Ralph 1988). Aufgrund der Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom gewählten Lösungsmittel (im Rahmen dieser Arbeit wurde Dimethylsulfoxid statt Aceton verwendet, da dieses Lösungsmittel sich als ideal für die Aufnahme von DHP-Spektren erwiesen hatte und die Modellsubstanzen für die Zuordnung der Signale in den Polymer-Spektren verwendet werden sollten) war eine Nachmessung der Spektren notwendig. Mit Hilfe eines 1H , ^{13}C -COSY wurde die direkte Kopplung der Seitenketten-C-Atome (C- α bei 71.71 ppm; C- β bei 83.79 ppm, C- γ bei 60.15 ppm) mit den entsprechenden H-Atomen nachgewiesen (Abb. 68 A). Die Signale von C-2 (111.30 ppm), C-5 (114.60 ppm) und C-6 (119.56 ppm) aus Ring A konnten mittels 1H , ^{13}C -COSY über die Kreuzsignale von H-2, H-5 und H-6 ermittelt werden. Die Signale der weiteren C-Atome von Ring A konnten durch Vergleich mit dem von Vanillylalkohol (4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol), einem Strukturanalogen für den A-Ring, registrierten ^{13}C -NMR-Spektrum ermittelt werden (C-1: 133.28 ppm; C-3: 146.99 ppm; C-4: 145.47 ppm).

Tab. 27. ^{13}C -NMR-Daten von Guajacylglycerol- β -guajacylether und Zuordnung der Signale zu den entsprechenden C-Atomen.

Zuordnung	Chem. Verschiebung (ppm)	Long range-Kopplungen (COLOC)
Seitenkette		
C- α	71.71	^2J (OH- α); ^4J (H-2)
C- β	83.79	^3J (OH- β); ^3J (OH- α)
C- γ	60.15	-
A-Ring		
C-1	133.28	^2J (H-2); ^2J (H- α); ^3J (H-5); ^3J (OH- α)
C-2	111.30	^3J (H-6); ^3J (H- α)
C-3	146.99	^2J (H-2); ^3J (OCH ₃ -3); ^3J (H-5);
C-4	145.47	^3J (H-2); ^4J (H-6)
C-5	114.60	^2J (H-6)
C-6	119.56	^2J (H-5); ^3J (H-2); ^3J (H- α)
OCH ₃ -3	55.47	-
B-Ring		
C-1'	148.13	^4J (H-6'); ^4J (H-4')
C-2'	149.81	^2J (H-3'); ^3J (OCH ₃ -2'); ^3J (H-4'); ^3J (H-6')
C-3'	112.75	^2J (H-4')
C-4'	121.02	^2J (H-3'); ^3J (H-6')
C-5'	120.68	^2J (H-6'); ^3J (H-3')
C-6'	116.00	^2J (H-5')
OCH ₃ -2'	55.63	-

Das Auftreten der Kreuzsignale von C-1, C-3 und C-4 mit den H-Atomen von Ring A im ^1H , ^{13}C -COLOC, das C-H-Konnektivitäten über mehr als eine Bindung liefert, war ein weiterer Beweis für die korrekte Zuordnung (Abb. 68 B). Durch den Einfluß der zwei Substituenten in Ring B sollten sämtliche C-Atome im Vergleich mit Benzol (128.5 ppm) stärker abgeschirmt sein, deren Signal also bei höherem Feld erscheinen. Dieser Einfluß wirkte sich für C-3' (112.8 ppm) und C-6' (116.0 ppm) deutlicher aus als für C-4' (121.02 ppm) und C-5' (120.7 ppm). Eine endgültige Zuordnung wurde durch Vergleich der Informationen aus ^1H , ^{13}C -COSY- und ^1H , ^{13}C -COLOC-Experimenten möglich (Tab. 27). Zusätzlich wurde durch das COLOC-Experiment die Zuordnung der Signale quartärer C-Atome, deren ^3J - und ^4J -Konnektivitäten mit räumlich weiter entfernten H-Atomen sichtbar waren, ermöglicht.

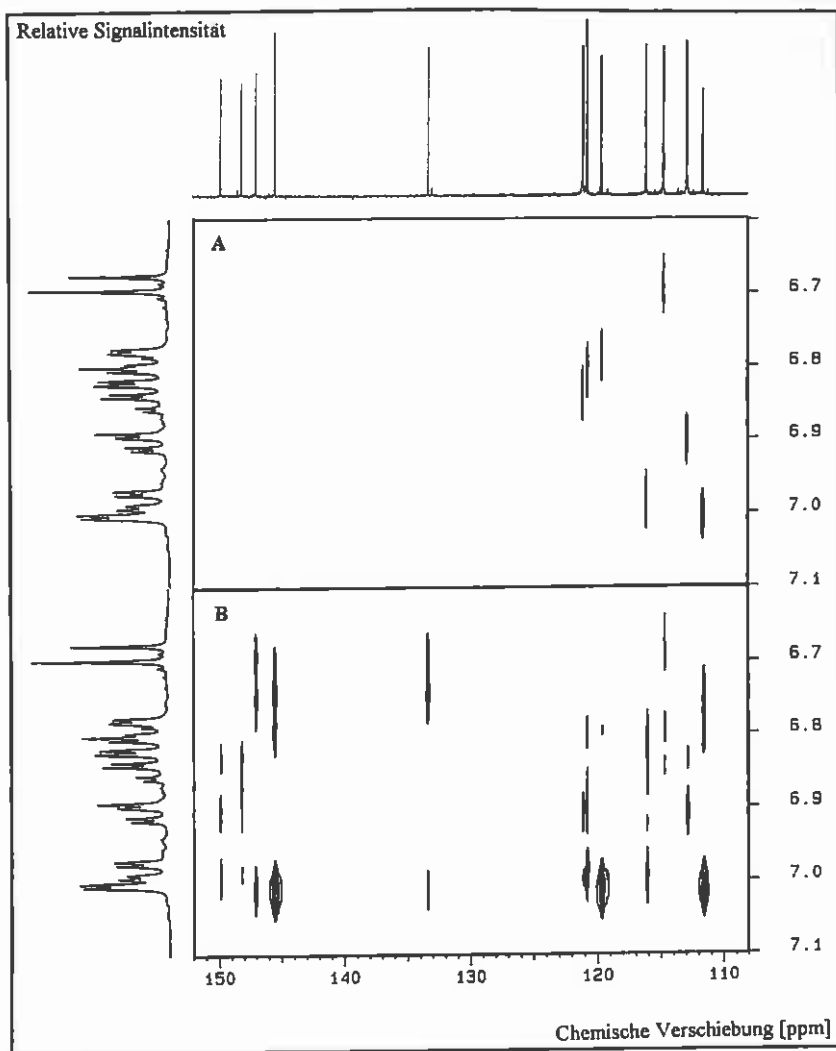
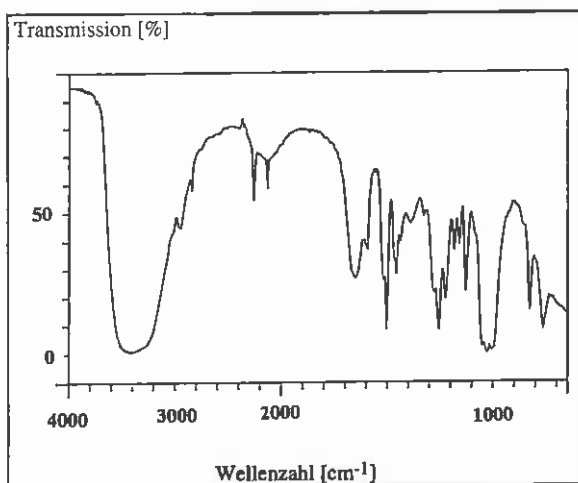


Abb. 68. ^1H , ^{13}C -COSY (A)- und ^1H , ^{13}C -COLOC (B)-NMR-Spektren von Guajacylglycerol- β -guajacylether in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K (nur der Aromatenbereich ist gezeigt).

Zusätzlich zu den NMR-Spektren wurde von Guajacylglycerol- β -guajacylether ein Fourier-Transformations-Infrarot (FT-IR)-Spektrum in Dimethylsulfoxid (Abb. 69) aufgenommen. Die Zuordnung der dabei auftretenden Banden ist in Tab. 28 gegeben.

Abb. 69. FT-IR-Spektrum von Gauajacylglycerol- β -guajacylether in Dimethylsulfoxid.



Tab. 28. Zuordnung der Banden im FT-IR-Spektrum von Gauajacylglycerol- β -guajacylether in Dimethylsulfoxid.

Bande [cm ⁻¹]	Intensität	Zuordnung der Bande
3395	+++	O-H-Valenzschwingungen
2954	+	C-H-Valenzschwingungen in Methyl- und Methylen- gruppen
2837	+-	C-H-Valenzschwingungen in OCH ₃
1595	+++	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten
1464	++	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten
1262	+++	C-O-Valenzschwingung in Arylalkylethern
1226	++	C-H-Deformationsschwingungen
830	++	C-H-Deformationsschwingungen (out of plane) bei 1,3,4- Trisubstitution (Ring A)
760	++	C-H-Deformationsschwingungen (out of plane) bei 1,2- Disubstitution (Ring B)

Coniferylaldehyd

Die käufliche Chemikalie Coniferylaldehyd (Aldrich, Steinheim) wurde direkt für die Synthese von Modellsubstanzen eingesetzt. Das Produkt war laut Dioden-Array-HPLC zu ca. 90 % rein. Die Identität der Verbindung wurde mittels UV- (Abb. 70; Maximum bei 340 nm), NMR- und FT-IR-Spektroskopie bestätigt.

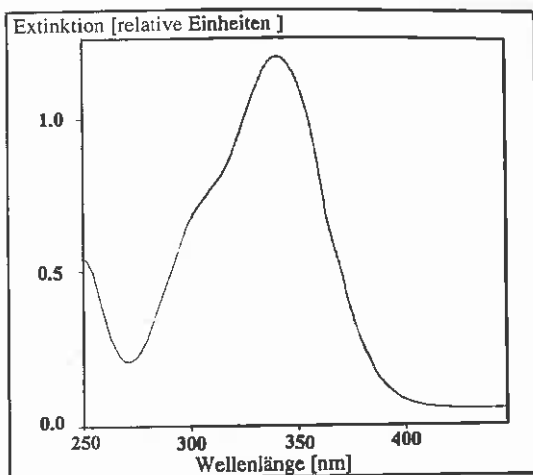


Abb. 70. UV-Spektrum von Coniferylaldehyd

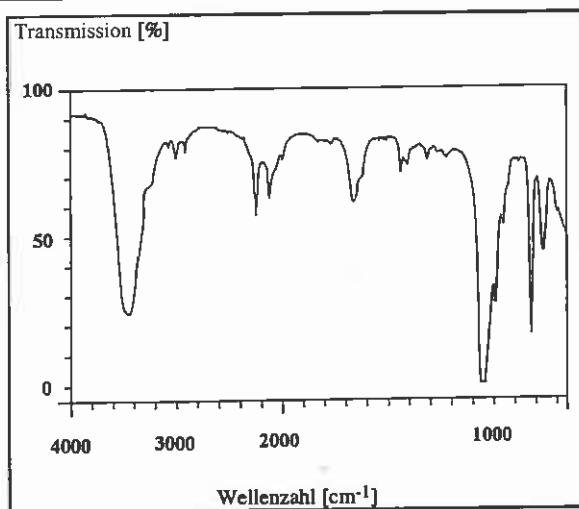
Die Zuordnung der H-Atome im ^1H -NMR-Spektrum von Coniferylaldehyd ist in Tab. 29 gezeigt. Die aromatischen H-Atome erschienen als AMX-System bei 6.82 ppm (H-5), 7.15 ppm (H-6) und 7.33 ppm (H-2). Diese Signalgruppe wurde von den Signalen von H- α (7.58 ppm) und H- β (6.76 ppm) der olefinischen Seitenkette, deren Kopplungskonstante (15.8 Hz) auf das Vorliegen einer *trans*-Konformation hinwies, eingerahmt. H- β zeigte noch eine zusätzliche Kopplung zu C- γ (9.58 ppm) mit einer Kopplungskonstante von 7.9 Hz.

Tab. 29. ^1H -NMR-spektroskopische Daten von Coniferylaldehyd in d_6 -Dimethylsulfoxid und Zuordnung der Signale.

Zuordnung	Multiplizität	Chem. Verschiebung (ppm)	Kopplungskonstanten (J [Hz])
H-2	d	7.33	2.0 (^4J (H-6))
H-5	d	6.82	8.1 (^3J (H-6))
H-6	dd	7.15	8.1 (^3J (H-5)); 2.0 (^4J (H-2))
OCH ₃ -3	s	3.82	-
H- α	d	7.58	15.8 (^3J (H- β))
H- β	dd	6.76	15.8 (^3J (H- α)); 7.9 (^3J (H- γ))
H- γ	d	9.58	7.9 (^3J (H- β))

Von Coniferylaldehyd wurde zusätzlich ein FT-IR-Spektrum (Abb. 71) in Dimethylsulfoxid aufgenommen. Die Zuordnung der auftretenden Banden ist in Tab. 30 zu finden.

Abb. 71. FT-IR-Spektrum von Coniferylalkohol in Dimethylsulfoxid.



Tab. 30. Zuordnung der Banden im FT-IR-Spektrum von Coniferylaldehyd in Dimethylsulfoxid.

Bande [cm ⁻¹]	Intensität	Zuordnung der Bande
3395	+++	O-H-Valenzschwingungen
2954	+	C-H-Valenzschwingungen in Methyl- und Methylengruppen
2837	+	C-H-Valenzschwingungen in OCH ₃
1595	+++	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten
1464	++	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten
1262	+++	C-O-Valenzschwingung in Arylalkylethern
1226	++	C-H-Deformationsschwingungen
830	++	C-H-Deformationsschwingungen (out of plane) bei 1,3,4-Trisubstitution (aromatischer Ring)

3,4-Dichloranilin

Für sämtliche Synthesen wurde käufliches 3,4-Dichloranilin (Riedel-de-Haen, Seelze, Niederlande) der Qualität „pestanal“ ohne weitere Reinigung verwendet. Zur Überprüfung der Identität des Produktes wurden UV- (Abb. 72; Maximum bei 245 nm, Schulter bei 302 nm) und NMR-Spektren (Tab. 31) aufgenommen.

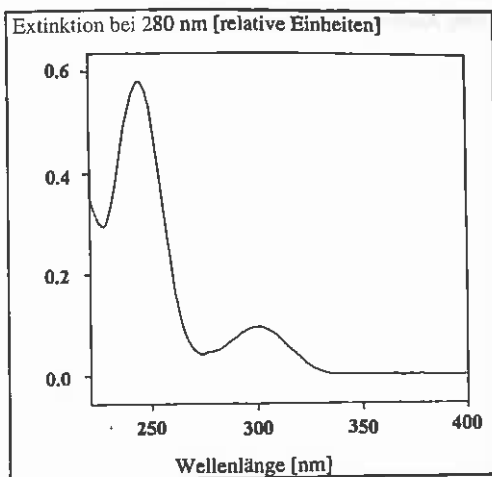


Abb. 72. UV-Spektrum von 3,4-Dichloranilin in Acetonitril.

Die NMR-spektroskopischen Daten von 3,4-Dichloranilin sind Tab. 31 zu entnehmen. Im ^1H -NMR-Spektrum erschien das für eine 1,3,4-Trisubstitution charakteristische AMX-System mit einem Doppeldublett von H-6 bei 6.51 ppm, einem Dublett von H-5 (3J (H-6) 7.16 ppm) mit einer Kopplungskonstante von 8.7 Hz, sowie einem weiteren Dublett bei 6.73 ppm und einer Kopplungskonstante von 2.6 Hz (4J (H-6)). Die Zuordnung der C-Atome im ^{13}C -NMR-Spektrum gelang durch selektive heteronukleare Entkopplung der aromatischen H-Atome. Die Intensität der an diese H-Atome gebundenen C-Atome wurde wegen des dabei auftretenden Kern-Overhauser-Effekts (NOE) um ein vielfaches angehoben. Auf diese Weise wurde die chemische Verschiebung von C-2 (114.5 ppm), C-5 (130.4 ppm) und C-6 (114.0 ppm) erhalten. Die chemischen Verschiebungen der sonstigen C-Atome wurden durch Inkrement-Berechnungen ermittelt (Meier 1987).

Tab. 31. ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopische Daten von 3,4-Dichloranilin in d_6 -Dimethylsulfoxid und Zuordnung der Signale (d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K).

Zuordnung	Multiplizität	δ [ppm]	Kopplungskonstanten [J [Hz]]	Zuordnung	[ppm]
H-2	d	6.73	2.6 (4J (H-6))	C-1	149.05
				C-2	114.47
				C-3	130.87
				C-4	116.00
H-5	d	7.16	8.7 (3J (H-6))	C-5	130.39
H-6	dd	6.51	8.7 (3J (H-5)); 2.6 (4J (H-2))	C-6	113.99

[¹⁵N] Anilin

Das käufliche Produkt [¹⁵N] Anilin (Chemotrade, Leipzig) wurde ohne vorherige Reinigung für die Synthesen eingesetzt. Zur Charakterisierung wurden UV- (Abb. 73; Maximum bei 253 nm) und NMR-Spektren (Tab. 32) aufgenommen.

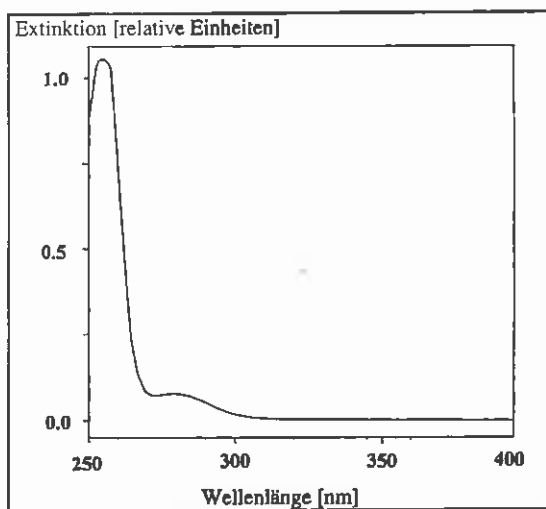


Abb. 73. UV-Spektrum von [¹⁵N] Anilin in Wasser.

Die erhaltenen NMR-Daten stimmten mit Literaturwerten (Meier 1987) sehr gut überein (Tab. 32). Zusätzlich wurden die ¹J (¹⁵N-¹³C)-Kopplungen von C-1 (11.7 Hz), C-2,6 (2.6 Hz) und C-3,5 (1.2 Hz) bestimmt. Deren Wert verringerte sich mit zunehmendem Abstand vom [¹⁵N] Anilin-Stickstoff. Das ¹H-entkoppelte ¹⁵N-NMR-Spektrum von [¹⁵N] Anilin zeigte ein Singulett für den Anilin-Stickstoff bei -323.67 ppm und war damit im Einklang mit den Literaturdaten (Berger et al. 1992).

Tab. 32. ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopische Daten von [¹⁵N] Anilin in *d*₆-Dimethylsulfoxid bei 303 K und Zuordnung der Signale.

H-Atom	M	δ [ppm]	Kopplungskonstanten (J [Hz])	C-Atom	M	δ [ppm]	Kopplungskonstanten (ⁿ J (¹⁵ N- ¹³ C) [Hz])
H-2,6	dd	6.53	8.3 (² J(H-3 bzw. H-5)); 2.4 (⁴ J(H-6 bzw. H-2))	C-1	d	148.33	11.7 (¹ J)
H-3,5	td	7.00	8.3 (² J(H-4,5 bzw. H-4,6)); 2.6 (⁴ J(H-2 bzw. H-6))	C-2,6	d	114.64	2.6 (² J)
H-4	tt	6.62	8.3 (² J(H-3,5)); 2.4 (⁴ J(H-2,6))	C-3,5	d	129.24	1.2 (² J)
				C-4	s	116.96	-

3.2.2 Charakterisierung der Modellschubstanzen

3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dichlorphenylamino)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1-ol

Die Synthese dieser Modellverbindung gelang in zwei Reaktionsschritten. Zunächst wurde die Hydroxylgruppe in α -Position der aliphatischen Seitenkette von *erythro*-Guajacylglycerol- β -guajacylether über eine nukleophile Substitution (Reaktionsmechanismus S_N2) mit Trimethylsilylbromid gegen Brom ausgetauscht. Die Extraktion des Produktes gegen gesättigte wäßrige NaHCO_3 - und dann gesättigte NaCl -Lösung ergab ein Chinonmethid (unimolekulare Elimination), an welches in Benzylposition 3,4-Dichloranilin addiert (anti-Addition an exocyclische Doppelbindung) wurde. Als Hauptprodukt der Reaktion (85 % nach Massgabe der Dioden-Array-Detektion bei 280 nm) wurde ein Stereoisomeren-Gemisch, bestehend aus dem *threo*- (DCA-Mod 1; Abb. 74 A) und dem *erythro*-Isomer (DCA-Mod 2, Abb. 74 B) der Modellverbindung, erhalten. Das Verhältnis *threo*/*erythro*-Isomer betrug 80 : 20.

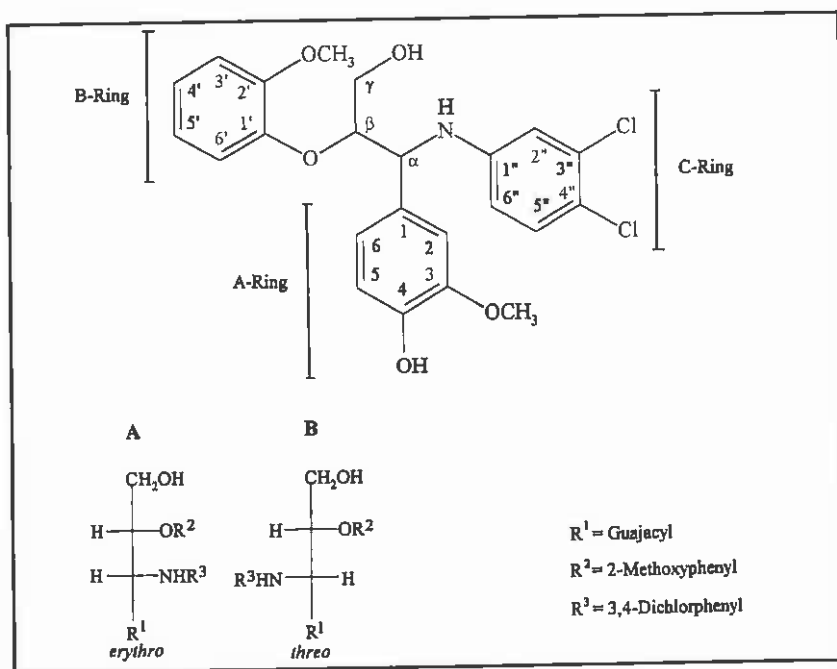


Abb. 74. Struktur von (A) DCA-Mod 1 und (B) DCA-Mod 2 mit Bezeichnung der Strukturelemente (unten Fischer-Projektionsformeln).

Das Isomerengemisch wurde mittels präparativer HPLC bis zu einem Reinheitsgrad von 95 % aufgereinigt (Abtrennung der Edukte). Die Signalzuordnung der Seitenketten-C- und H-Atome von DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2 gelang aus den NMR-Spektren des Isomerengemisches. Eine Anreicherung von DCA-Mod 2 durch diastereospezifische Reinigungsverfahren wurde wegen der geringen Substanzmenge, die zur Verfügung stand, nicht unternommen. Der Strukturvorschlag für beide Isomere der Modellsubstanz wurde mittels UV- (Abb. 75; Maximum bei 275 nm für beide Isomere) und NMR-Spektroskopie bestätigt.

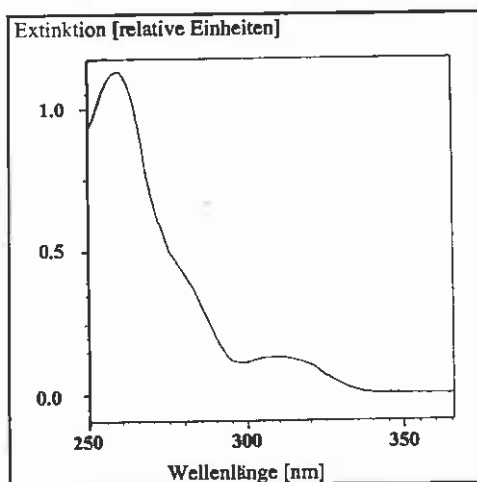


Abb. 75. UV-Spektrum von DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2 in Acetonitril.

Die NMR-Spektren des Isomerengemisches von DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2 (acetyliert) wiesen im Verschiebungsbereich der aliphatischen H- und C-Atome einige Veränderungen gegenüber der Synthesevorstufe Guajacylglycerol- β -guajacylether (acetyliert) auf. Das in Benzylposition befindliche α -H-Atom erschien bei 4.85 (*threo*) bzw. 4.81 ppm (*erythro*; statt 5.91 ppm in Guajacylglycerol- β -guajacylether), das entsprechende α -C-Atom bei 57.34 (*threo*) bzw. 57.00 ppm (*erythro*; statt 73.91 ppm in der Synthesevorstufe). Diese Hochfeld-Verschiebung der Signale zeigte den Einfluß des direkt an diese Position gebundenen aromatischenamins an. Die Auswirkung der Addition von 3,4-Dichloranilin an das Benzyl-C-Atom war in β -Position geringer als in α -Stellung. Das Signal von H- β war bei 4.66 (*threo*) bzw. 4.72 ppm (*erythro*; statt 4.82 ppm in Guajacylglycerol- β -guajacylether), jenes von C- β bei 80.64 (*threo*) bzw. 79.95 ppm (*erythro*; statt 79.48 ppm) zu finden. In γ -Position wirkte sich die α -Substitution der Hydroxylgruppe gegen 3,4-Dichloranilin nur geringfügig aus (^1H : 4.05 und 4.16 ppm (γ_1 und γ_2 in *threo*) bzw. 4.15 und 4.27 ppm (γ_1 und γ_2 in *erythro*) statt 4.19, 4.32 ppm in Guajacylglycerol- β -guajacylether; ^{13}C : 63.15 (*threo*) und 63.10 ppm (*erythro*) statt 62.58 ppm).

In den aromatischen Ringen A und B veränderten sich die chemischen Verschiebungen von DCA-Mod 1 gegenüber der Synthesevorstufe kaum und die Signale konnten mit Hilfe verschiedener Korrelationsspektren ($^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY; $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -COLOC) zugeordnet werden (Tab. 33). Eine eindeutige Interpretation der NMR-Spektren von DCA-Mod 2 konnte wegen der geringen Intensität der Signale im Aromatenbereich aufgrund der geringen Substanzmenge nicht erreicht werden. Die quantitative ^1H -NMR-Analyse der Intensitäten der Acetyl- CH_3 an C- γ bestätigte das Vorliegen einer 80:20 *threolerythro*-Isomerenmischung. Die in DCA-Mod 1 gegenüber Guajacylglycerol- β -guajacylether neu auftretenden Signale von Ring C erschienen im ^1H -NMR-Spektrum als AMX-System bei 6.64 ppm (H-6''), 6.88 ppm (H-2'') und 7.20 ppm (H-5''). Ihre zweifelsfreie Zuordnung gelang mit Hilfe eines $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSYs, welches die Kopplungen der H-Atome von Ring C aufzeigt (Abb. 76).

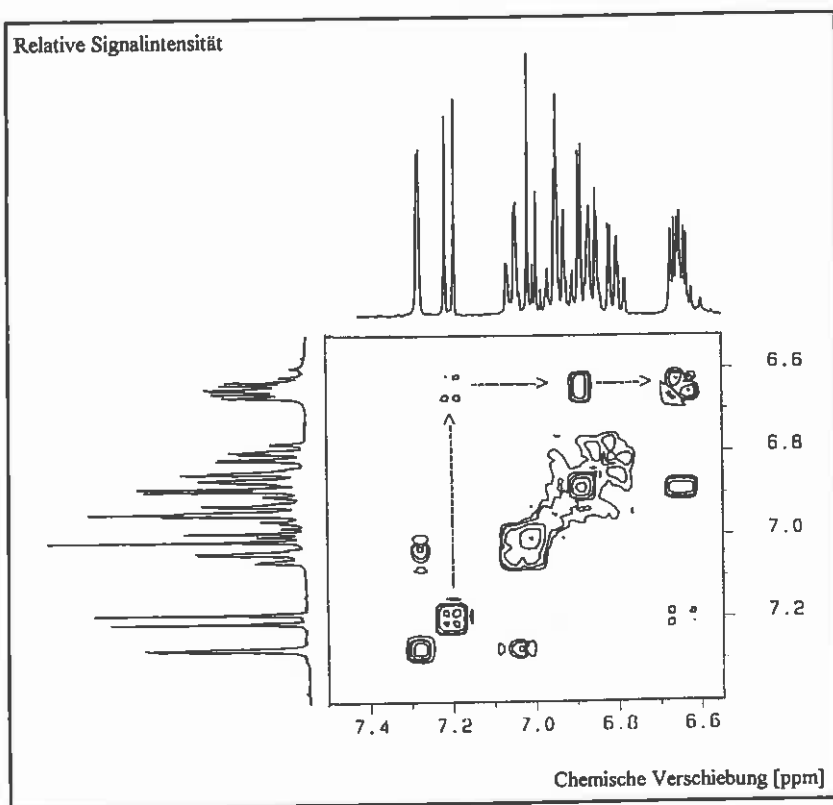


Abb. 76. $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum des Isomerengemisches DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2 in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K (nur aromatische H-Atome gezeigt). Kennzeichnung des AMX-Systems des C-Ringes von DCA-Mod 1 mit $\text{---}\rightarrow$.

Tab. 33. ^1H -NMR-Daten von DCA-Mod 1 (acetyliert) in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K und Zuordnung der Signale zu den entsprechenden H-Atomen.

Zuordnung	Multiplizität	Chem. Verschiebung [ppm]	Kopplungskonstanten (J [Hz])
Seitenkette			
H- α (<i>threo</i>)	t	4.83	5.4 (^3J (H- β))
H- α (<i>erythro</i>)	t	4.81	ca. 5.3 (^3J (H- β))
H- β (<i>threo</i>)	m	4.66	komplex
H- β (<i>erythro</i>)	m	4.72	komplex
H- γ (<i>threo</i>)	2 x dd	4.05 (γ_1); 4.16 (γ_2)	6.0 (^3J (γ_1 /H- β)); 4.1 (^3J (γ_2 /H- β))
H- γ (<i>erythro</i>)	2 x dd	4.15 (γ_1); 4.27 (γ_2)	ca. 4.0 (^3J (γ_2 /H- β))
CH ₃ (Acetyl an OH- γ , <i>threo</i>)	s	2.05	-
CH ₃ (Acetyl an OH- γ , <i>erythro</i>)	s	2.15	-
A-Ring (<i>threo</i>)			
H-2	d	7.28	2.3 (^4J (H-6))
H-5	d	7.00	8.2 (^3J (H-6))
H-6	dd	6.79	8.2 (^3J (H-6)); 2.3 (^4J (H-6))
OCH ₃ -3	s	3.70	-
CH ₃ (Acetyl an OH-4)	s	2.21	-
B-Ring (<i>threo</i>)			
H-3'	dd	6.95	8.0 (^3J (H-4')); 1.8 (^4J (H-5'))
H-4'	td	6.86	8.1 (^3J (H-5', H-3')); 2.0 (^4J (H-6'))
H-5'	m	6.80	8.2 (^3J (H-4'; H-6')); 1.8 (^4J (H-3'))
H-6'	dd	6.93	8.2 (^3J (H-5')); 2.0 (^3J (H-4'))
OCH ₃ -2'	s	3.73	-
C-Ring (<i>threo</i>)			
H-2''	dd	6.88	2.7 (^4J (H-5''))
H-5''	td	7.20	8.8 (^3J (H-6''))
H-6''	m	6.64	8.8 (^3J (H-5'')); 2.7 (^4J (H-2''))

Die C-Atome C-2'', C-5'' und C-6'' konnten wegen des Auftretens von Kreuzsignalen mit den entsprechenden H-Atomen im ^1H , ^{13}C -COSY zugeordnet werden. Die Zuordnung der verbleibenden C-Atome des C-Ringes ergab sich aus den Long-Range-Kopplungen mit den bereits zugeordneten Resonanzen im ^1H , ^{13}C -COLOC. C-1'' zeigte dabei Kopplungen mit H-2'' und H-5'', C-3'' mit H-2'' und H-5'', sowie C-4'' mit H-2'' und H-6'' (Tab. 34).

Tab. 34. ^{13}C -NMR-Daten von DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2 (acetyliert) in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K und Zuordnung der Signale zu den entsprechenden C-Atomen.

Zuordnung	Chem. Verschiebung (ppm)	(C-H)-Long range-Kopplungen (COLOC)
Seitenkette		
C- α (<i>threo</i>)	57.34	^3J (H-B)
C- α (<i>erythro</i>)	57.00	-
C-B (<i>threo</i>)	80.64	^3J (H- α); ^3J (H- γ_1); ^3J (H- γ_2)
C-B (<i>erythro</i>)	79.95	-
C- γ (<i>threo</i>)	63.15	^3J (H-B);
C- γ (<i>erythro</i>)	63.10	-
A-Ring (<i>threo</i>)		
C-1	138.5	^4J (H-2); ^4J (H-6)
C-2	112.05	-
C-3	150.61	^2J (H-2)
C-4	138.30	^3J (H-2); ^3J (H-6)
C-5	122.39	-
C-6	119.45	^3J (H-2)
OCH ₃ -3	55.49	-
B-Ring (<i>threo</i>)		
C-1'	147.19	-
C-2'	150.28	^2J (H-3')
C-3'	112.69	-
C-4'	124.38	-
C-5'	122.64	-
C-6'	120.58	^2J (H-5')
OCH ₃ -2'	55.70	-
C-Ring (<i>threo</i>)		
C-1''	147.86	^4J (H-2''); ^3J (H-5'')
C-2''	113.86	-
C-3''	131.04	^2J (H-2''); ^3J (H-5'')
C-4''	116.95	^3J (H-2''); ^3J (H-6'')
C-5''	130.30	-
C-6''	113.24	^3J (H-2'')

3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylamino-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1-ol

Neben DCA-Mod 1 und DCA-Mod 2 wurden auf dem gleichen synthetischen Weg Strukturanaloga mit [^{15}N] Anilin als Edukt gewonnen (Abb. 77). Es entstand wiederum ein 80:20 *threo/erythro*-Isomerengemisch (Ani-Mod 1 (*threo*) bzw. Ani-Mod 2 (*erythro*)). Ein entscheidender Vorteil dieser Modellverbindungen gegenüber jenen, die 3,4-Dichloranilin als Strukturbaustein enthielten, waren die verbesserten Aufnahmebedingungen für die ^{15}N -NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung der chemischen Umgebung des Anilin-Stickstoffs. Die Identität der Verbindungen wurde mittels UV- (Abb. 78; Maximum bei 274 nm für beide Isomere), NMR- und FT-IR-Spektroskopie (Tab. 37) belegt.

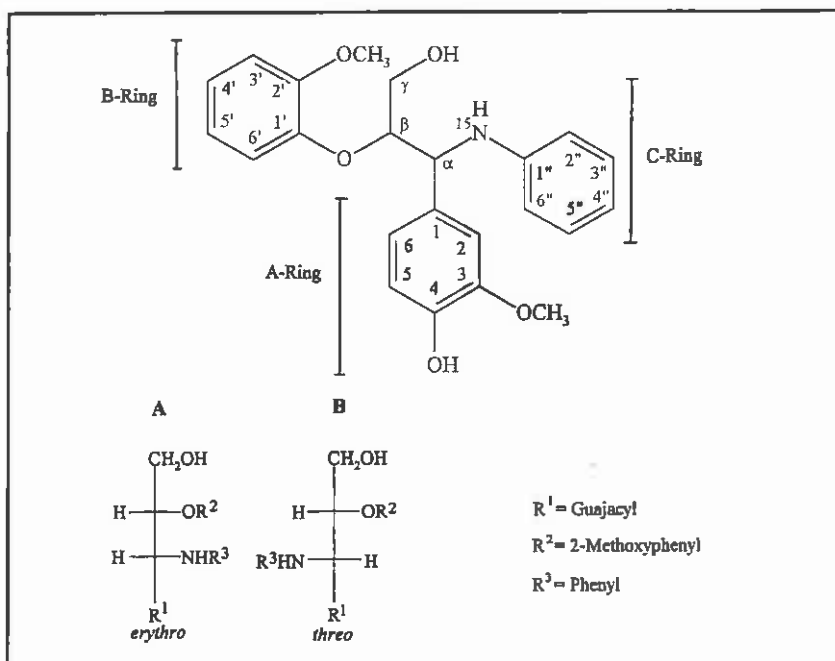


Abb. 77. Struktur von (A) Ani-Mod 1 und (B) Ani-Mod 2 mit Bezeichnung der Strukturelemente (unten Fischer-Projektionsformeln).

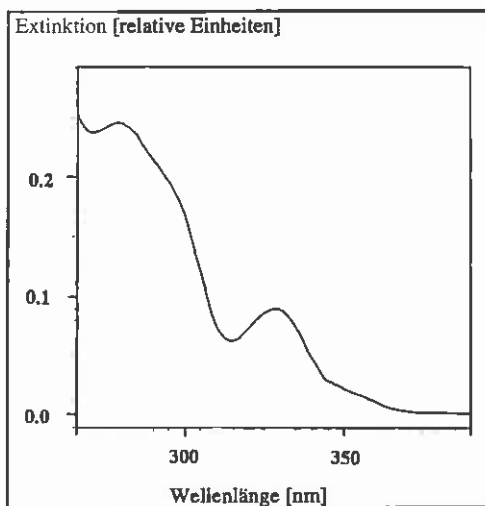


Abb. 78. UV-Spektrum von Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2 in Acetonitril.

Die Auswertung der NMR-Spektren von Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2 erfolgte analog zum Vorgehen bei DCA-Mod 1. Bei der Zuordnung der Signale traten die folgenden Unterschiede auf: Das Signal von C- α (56.65 ppm in Ani-Mod 1; 57.04 ppm in Ani-Mod 2) spaltete wegen der Kopplung zum ^{15}N des Anilins in ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 9.9 Hz auf. Im Bereich der aromatischen H-Atome von Ani-Mod 1 traten gegenüber der synthetischen Vorstufe Guajacylglycerol- β -guajacylether drei neue Signale eines AA'BB'C-Systems bei 6.48 ppm (H-4''), 6.56 ppm (H-2'', H-6'') und 6.98 ppm (H-3'', H-5'') auf. Deren Zuordnung war mit Hilfe eines ^1H , ^1H -COSYs möglich (Tab. 35). Die Zuordnung der ^{13}C -Signale gelang mit Hilfe von ^1H , ^{13}C -COSY- (Abb. 79) und COLOC-Spektren (Tab. 36). Die chemischen Verschiebungen der Signale von Ani-Mod 2 waren denen von Ani-Mod 1 sehr ähnlich. Das Verhältnis der Signal-Intensitäten in den quantitativen ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren betrug in etwa 80:20 (Ani-Mod 1/Ani-Mod 2) und entsprach damit den mittels HPLC ermittelten relativen Anteilen.

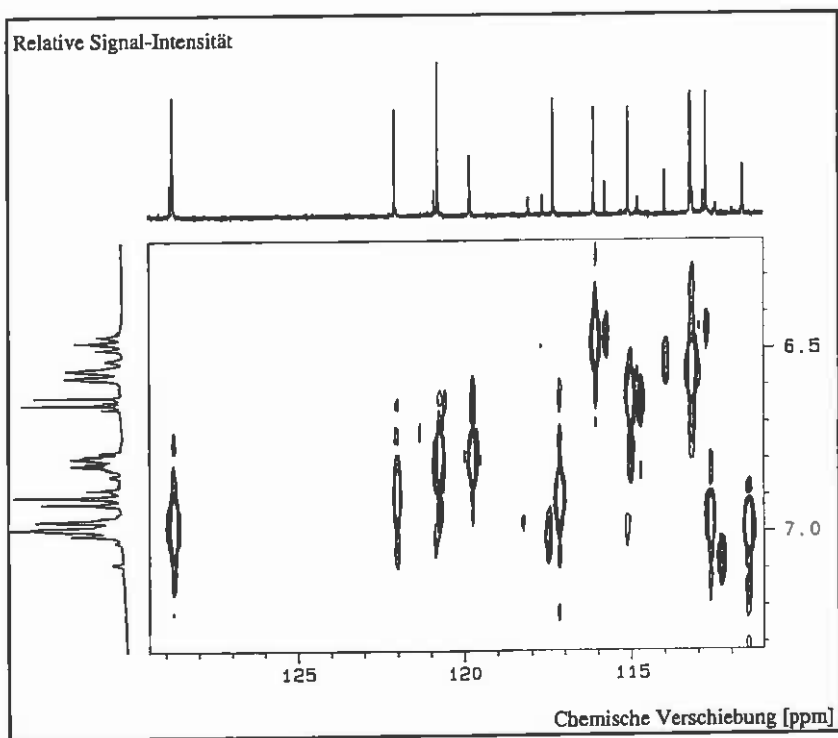


Abb. 79. ^1H , ^{13}C -COSY-NMR-Spektrum des Isomerengemisches Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2 in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K.

Tab. 35. ^1H -NMR-spektroskopische Daten von Ani-Mod 1 (threo-Isomer) und Ani-Mod 2 (erythro-Isomer) in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K und Zuordnung der Signale.

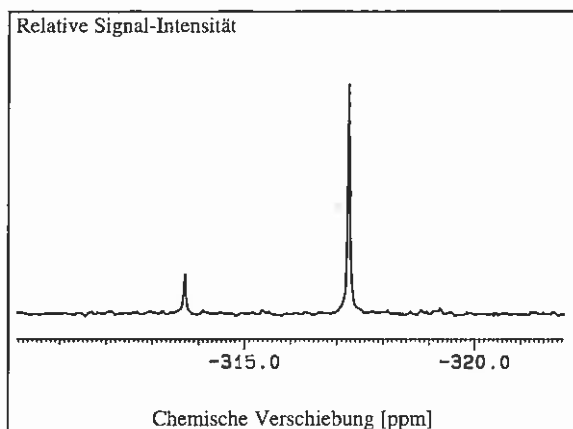
Zuordnung	Multiplizität	Chemische Verschiebung (δ [ppm])	Kopplungskonstanten (J [Hz])
Seitenkette			
H- α (threo)	d	4.62	4.0 ($^3J(\text{H-}\beta)$)
H- α (erythro)	d	4.59	4.2 ($^3J(\text{H-}\beta)$)
H- β (threo)	m	4.30	komplex
H- β (erythro)	m	4.41	komplex
H- γ (threo)	m	3.39 (H- γ_1); 3.63 (H- γ_2)	11.4 ($^2J(\text{H-}\gamma_1/\text{H-}\gamma_2)$); 5.1 ($^3J(\text{H-}\gamma_1/\text{H-}\beta)$)
H- γ (erythro)	m	3.45 (H- γ_1); 3.54 (H- γ_2)	5.7 ($^3J(\text{H-}\gamma_2/\text{H-}\beta)$)
			nicht quantifizierbar
A-Ring			
H-2 (threo)	m	6.98	komplex
H-2 (erythro)	d	7.07	2.0 ($^4J(\text{H-}6)$)
H-5 (threo)	d	6.63	8.0 ($^3J(\text{H-}6)$)
H-5 (erythro)	d	6.64	8.1 ($^3J(\text{H-}6)$)
H-6 (threo)	dd	6.79	8.0 ($^3J(\text{H-}5)$);
H-6 (erythro)	m	6.80	nicht quantifizierbar
OCH ₃ -3 (threo)	s	3.78	-
OCH ₃ -3 (erythro)	s	3.79	-
B-Ring			
H-3' (threo)	dd	6.97	8.1 ($^2J(\text{H-}4')$)
H-3' (erythro)	m	6.97	komplex
H-4' (threo)	td	6.89	7.6 ($^3J(\text{H-}3', \text{H-}5')$); 1.7 ($^4J(\text{H-}6')$)
H-4' (erythro)	m	6.89	komplex
H-5' (threo)	m	6.79	7.9 ($^3J(\text{H-}4', \text{H-}6')$); 1.65 ($^4J(\text{H-}3')$)
H-5' (erythro)	m	6.81	komplex
H-6' (threo)	m	6.90	komplex
H-6' (erythro)	dd	7.01	7.9 ($^3J(\text{H-}5')$)
OCH ₃ -2' (threo)	s	3.67	-
OCH ₃ -2' (erythro)	s	3.72	-
C-Ring			
H-2'', H-6'' (threo)	dd	6.55	8.4 ($^3J(\text{H-}3'', \text{H-}5'')$)
H-2'', H-6'' (erythro)	dd	6.53	8.4 ($^3J(\text{H-}3'', \text{H-}5'')$)
H-3'', H-5'' (threo)	m	6.98	komplex
H-3'', H-5'' (erythro)	m	6.98	komplex
H-4'' (threo)	t	6.47	7.2 ($^3J(\text{H-}3'', \text{H-}5'')$)
H-4'' (erythro)	t	6.46	7.2 ($^3J(\text{H-}3'', \text{H-}5'')$)

Tab. 36. ^{13}C -NMR-spektroskopische Daten von Ani-Mod 1 (threo-Isomer) und Ani-Mod 2 (erythro-Isomer) in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K und Zuordnung der Signale.

Zuordnung	Chem. Verschiebung [ppm]	Kreuzsignale im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY-NMR-Spektrum
Seitenkette		
C- α (threo)	56.65 (Dublett)	4.62 (H- α)
C- α (erythro)	57.05 (Dublett)	4.59 (H- α)
C- β (threo)	84.32	4.30 (H- β)
C- β (erythro)	83.55	4.31 (H- β)
C- γ (threo)	59.87	3.39 (H- γ_1); 3.63 (H- γ_2)
C- γ (erythro)	60.21	3.45 (H- γ_1); 3.54 (H- γ_2)
A-Ring		
C-1 (threo)	131.98	-
C-1 (erythro)	130.71	-
C-2 (threo)	111.53	6.98 (H-2)
C-2 (erythro)	112.35	7.07 (H-2)
C-3 (threo)	147.29	-
C-3 (erythro)	147.14	-
C-4 (threo)	145.33	-
C-4 (erythro)	145.39	-
C-5 (threo)	114.97	6.63 (H-5)
C-5 (erythro)	114.76	6.64 (H-5)
C-6 (threo)	119.71	6.79 (H-6)
C-6 (erythro)	119.72	6.80 (H-6)
OCH ₃ -3 (threo)	55.65	3.78 (Methoxy-H-Atome)
OCH ₃ -3 (erythro)	55.71	3.79 (Methoxy-H-Atome)
B-Ring		
C-1' (threo)	147.66	-
C-1' (erythro)	147.90	-
C-2' (threo)	150.08	-
C-2' (erythro)	150.17	-
C-3' (threo)	112.65	6.97 (H-3')
C-3' (erythro)	112.68	6.97 (H-3')
C-4' (threo)	121.96	6.89 (H-4')
C-4' (erythro)	121.95	7.05 (H-4')
C-5' (threo)	120.68	6.79 (H-5')
C-5' (erythro)	120.79	6.81 (H-5')
C-6' (threo)	117.23	6.90 (H-6')
C-6' (erythro)	117.55	7.01 (H-6')
OCH ₃ -2' (threo)	55.47	3.66 (Methoxy-H-Atome)
OCH ₃ -2' (erythro)	55.46	3.72 (Methoxy-H-Atome)
C-Ring		
C-1'' (threo)	147.92 (d)	-
C-1'' (erythro)	147.61 (d)	-
C-2'', C-6'' (threo)	113.10 (d)	6.55 (H-2'', H-6'')
C-2'', C-6'' (erythro)	113.89 (d)	6.53 (H-2'', H-6'')
C-3'', C-5'' (threo)	128.64 (d)	6.98 (H-3'', H-5'')
C-3'', C-5'' (erythro)	128.74 (d)	6.98 (H-3'', H-5'')
C-4'' (threo)	116.00	6.47 (H-4'')
C-4'' (erythro)	114.70	6.46 (H-4'')

Das ^{15}N -inverse-gated-NMR-Spektrum des Isomerengemisches Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2 in d_6 -Dimethylsulfoxid wies im ^1H -entkoppelten Spektrum zwei Signale bei -317.28 und -313.73 ppm mit einem Intensitätsverhältnis von 80:20 auf, die im gekoppelten Spektrum jeweils in ein Dublett aufspalteten. Somit ist genau ein H-Atom an jedes N-Atom gebunden (Abb. 80). Die relativen Signal-Intensitäten spiegeln das mit Hilfe von Dioden-Array-HPLC und quantitativer ^1H -NMR- sowie ^{13}C -NMR-Spektroskopie ermittelte *threo/erythro*-Mengenverhältnis von Ani-Mod 1 (80 %) zu Ani-Mod 2 (20 %) wieder.

Abb. 80. ^{15}N -INEPT-NMR-Spektrum des Isomerengemisches Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2.



Vom Isomerengemisch Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2 wurde ein FT-IR-Spektrum in Dimethylsulfoxid aufgenommen. Die Zuordnung der beobachteten Banden ist in Tab. 37 gegeben.

Tab. 37. Zuordnung der Banden im FT-IR-Spektrum des Isomerengemisches Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2 in Dimethylsulfoxid.

Bande [cm^{-1}]	Intensität	Zuordnung der Bande
3375	+++	O-H-Valenzschwingungen
2954	+	C-H-Valenzschwingungen in Methyl- und Methylengruppen
2837	+	C-H-Valenzschwingungen in OCH_3
1595	+++	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten
1464	++	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten
1262	+++	C-O-Valenzschwingung in Arylalkylethern
1226	++	C-H-Deformationsschwingungen
830	++	C-H-Deformationsschwingungen (out of plane) bei 1,3,4-Trisubstitution (Ring A)
753, 695		C-H-Deformationsschwingungen (out of plane) bei Monosubstitution (Ring C)
730	+++	C-H-Deformationsschwingungen (out of plane) bei 1,2-Disubstitution (Ring B)

N-(3,4-Dichlorphenyl)-N-iminoprop-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-en

Die Synthese eines Azomethins aus Coniferylaldehyd und 3,4-Dichloranilin (hier als DCA-Mod 3 bezeichnet) wurde in einer Einschritt-Reaktion direkt aus den Edukten erreicht. Das bei der Kondensation anfallende Wasser wurde durch Zugabe von Molekularsieb in die Reaktionslösung absorbiert. Das Reaktionsprodukt wurde mittels präparativer HPLC in einem Acetonitril/Wasser-Gradienten (s. II 15.3) gereinigt. Der Reinheitsgrad von DCA-Mod 3 (Abb. 81) betrug anschließend nach Maßgabe der Dioden-Array-Detektion bei 280 nm 94 %. Das Produkt wurde mittels UV- (Abb. 82; Maximum bei 345 nm), NMR- und FT-IR-Spektroskopie charakterisiert.

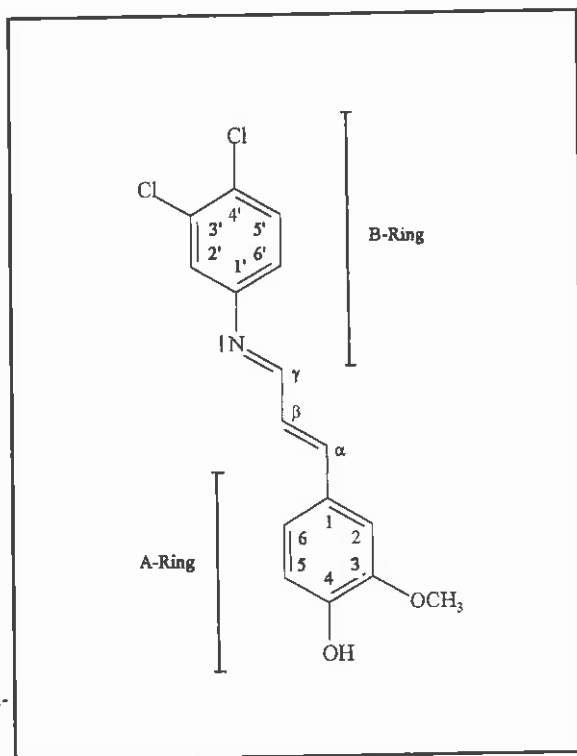


Abb. 81. Struktur von DCA-Mod 3 und Bezeichnung der Strukturelemente.

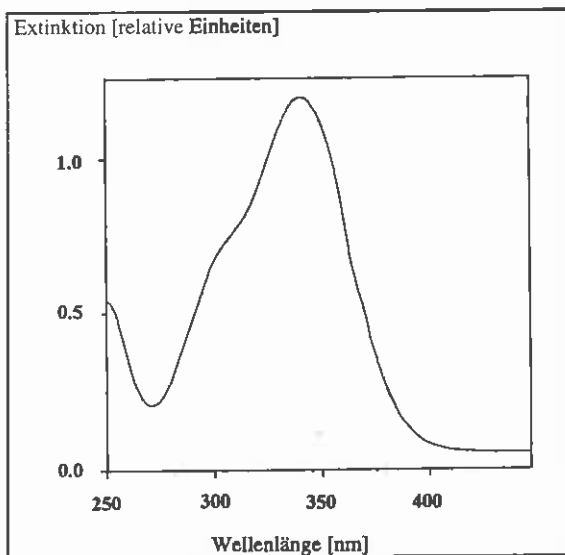


Abb. 82. UV-Spektrum von DCA-Mod 3

Das ^1H -NMR-Spektrum von DCA-Mod 3 wies zwei unterschiedliche aromatische AMX-Systeme auf. Die Kopplungssysteme konnten mit Hilfe eines ^1H , ^1H -COSYs unterschieden und die einzelnen Signale zugeordnet werden (Abb. 83). Die Verschiebungswerte der H-Atome aus Ring A (AMX-Spektrum 1) waren gegenüber Coniferylaldehyd nur geringfügig verändert (H-2 bei 7.28 ppm, H-5 bei 6.81 ppm und H-6 bei 7.07 ppm). Die H-Atome der Methoxygruppe erschienen bei 3.83 ppm. Das zweite AMX-Kopplungsmuster war auf die Bindung von 3,4-Dichloranilin in γ -Position der olefinischen Seitenkette zurückzuführen. Durch die Ausbildung einer Doppelbindung zwischen C- γ und dem Amin-Stickstoff wurden die chemischen Verschiebungen von H-2' (7.43 ppm), H-5' (7.61 ppm) und H-6' (7.17 ppm) gegenüber 3,4-Dichloranilin zu tieferem Feld hin verschoben. Die H-Atome der Doppelbindung wurden im Vergleich mit Coniferylaldehyd zum einen Teil Hochfeld- (H- α bei 7.28 statt bei 7.58 ppm) und zum anderen Teil Tieffeld- (H- β bei 7.02 statt bei 6.76 ppm) verschoben. H- γ erschien bei deutlich höherem Feld (8.37 ppm) als in Coniferylaldehyd (9.58 ppm) und zeigte eine Kopplung von 9.0 Hz zu H- β . Zur besseren Übersicht ist die Zuordnung der NMR-Daten in Tab. 38 gezeigt.

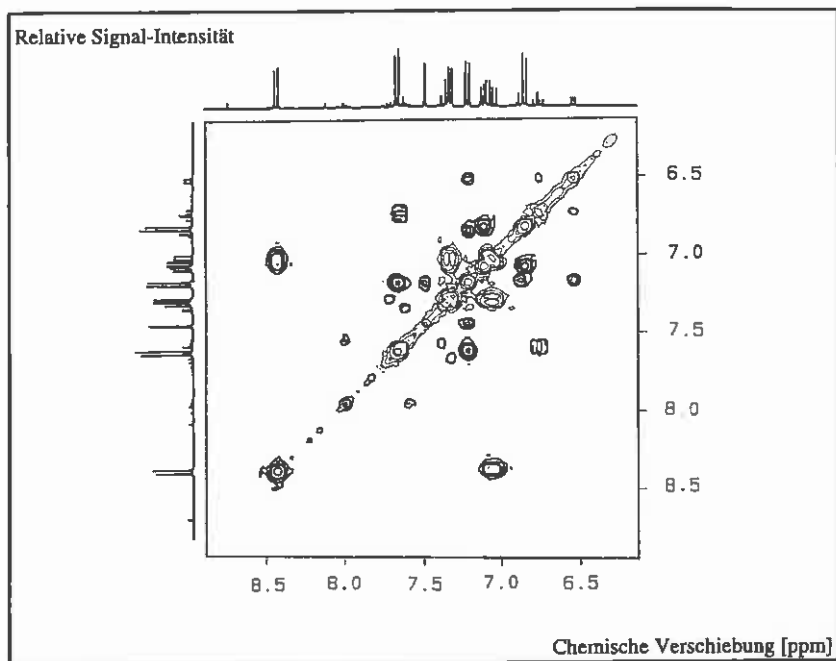


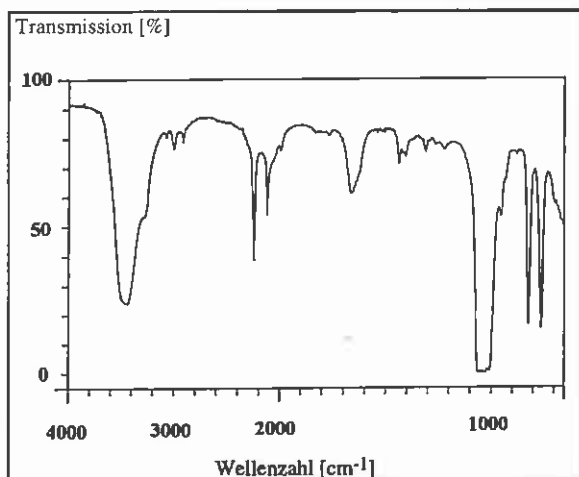
Abb. 83. ^1H , ^1H -COSY von DCA-Mod 3 in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K.

Tab. 38. ^1H -NMR-spektroskopische Daten von DCA-Mod 3 in d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K und Zuordnung der Signale.

Zuordnung	Multiplizität	Chem. Verschiebung (ppm)	Kopplungskonstanten (J [Hz])
Seitenkette			
H- α	d	7.28	15.7 (^3J (H-B))
H-B		7.02	15.7 (^3J (H- α)); 9.0 (^3J (H- γ))
H- γ	d	8.37	9.0 (^3J (H-B))
A-Ring			
H-2	d	7.28	2.0 (^4J (H-6))
H-5	d	6.81	8.1 (^3J (H-6))
H-6	dd	7.07	8.1 (^3J (H-5)); 2.0 (^4J (H-2))
OCH ₃ -3	s	3.83	-
B-Ring			
H-2'	d	7.43	2.4 (^4J (H-6'))
H-5'	d	7.61	9.0 (^3J (H-6'))
H-6'	dd	7.17	9.0 (^3J (H-5')); 2.4 (^4J (H-2'))

Zusätzlich zu den NMR-Spektren wurde von DCA-Mod 3 ein FT-IR-Spektrum in Dimethylsulfoxid (Abb. 84) aufgenommen. Die Zuordnung der dabei auftretenden Banden ist in Tab. 39 gegeben.

Abb. 84. FT-IR-Spektrum von DCA-Mod 3 in Dimethylsulfoxid.



Tab. 39. Zuordnung der Banden im FT-IR-Spektrum von DCA-Mod 3 in Dimethylsulfoxid.

Bande [cm ⁻¹]	Intensität	Zuordnung der Bande
3459	+++	O-H-Valenzschwingungen
3014	+	C-H-Valenzschwingungen in Aromaten
2915	+	C-H-Valenzschwingungen in Methyl- und Methylengruppen
1645	++	C=C-Valenzschwingungen in Aromaten
1235	+	C-H-Deformationsschwingungen
832	++	C-H-Deformationsschwingungen (out of plane) bei 1,3,4-Trisubstitution (Ring A und B)

3.2.3 Zuordnung der Bindungstypen von 3,4-Dichloranilin und [¹⁵N] Anilin in DHPs

Für die Signalzuordnung wurden die NMR-Spektren von Modellsubstanzen mit denen der entsprechenden DHPs verglichen. Im ¹H-NMR-Spektrum eines Copolymerisates von 3,4-Dichloranilin und Coniferylalkohol (DCA-DHP) traten zwischen 8-10 ppm zwei intensive Signale (8.75 und 8.83 ppm) auf, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung Aldehyd-H-Atomen oder Azomethin-H-Atomen (dies entspräche einer Bindung von DCA an Aldehyd-Seitenketten im Polymer) entsprechen könnten. Im ¹³C-NMR-Spektrum fehlten jedoch die entsprechenden Signale für die Aldehyd- bzw. Azomethin-C-Atome. Diese Signalgruppen

zeigten nach Maßgabe von ^1H , ^1H - und ^1H , ^{13}C -COSY-NMR-Spektren keinerlei Kopplungen zum Rest des Polymers, auch nicht über mehr als zwei Bindungen. Da im Spektrum von Guajacylglycerol- β -guajacylether ein Signal bei 8.70 ppm auftrat, darf angenommen werden, daß es sich um das Signal aromatischer Hydroxylgruppen in Nachbarschaft zu Methoxygruppen handelt, die in Dimethylsulfoxid nicht austauschen. Als die gleiche Probe fünf Monate nach erstmaliger Aufnahme der NMR-Spektren nochmals vermessen wurde, fehlte dieses Signal vollständig, während sämtliche ansonsten beobachteten Signale weiterhin mit der gleichen Intensität wie zuvor nachgewiesen wurden. Dies läßt sich durch Austauschphänomene mit der im Lösungsmittel im Laufe der Zeit kondensierenden Luftfeuchtigkeit erklären. Nach Zusatz von 0.1 M DCl wurde ein sofortiger quantitativer Austausch beobachtet. Der schlüssige Beweis, daß in DCA-DHP keine Bindung des DCAs an Coniferylaldehyd-Seitenketten auftritt, wurde durch die Synthese einer Modellschubstanz (DCA-Mod 3) für diesen Bindungstyp angetreten. Das Signal des Azomethin-H-Atoms erschien bei 8.37 ppm, jenes von Coniferylaldehyd bei 9.58 ppm. Im Bereich zwischen 7.60 und 8.70 ppm traten keine nachweisbaren Signale im ^1H -NMR-Spektrum von DCA-DHP auf. Bei 9.60 ppm war sowohl in DCA-DHP als auch in Ref-DHP (Polymerisat aus Coniferylalkohol) ein Signal (Dublett) mit einer äußerst geringen Intensität zu erkennen, daß Coniferylaldehyd-Endgruppen zuzuordnen war. Mittels Thioacidolyse (s. III 1.3.1) wurde für Coniferylaldehyd-Endgruppen ein Anteil von weniger als 4 % an monomeren und dimeren Abbauprodukten dieser Methode aus Ref-DHP ermittelt. Demnach hatte die Carbonylgruppe von Coniferylaldehyd in DHPs keine Relevanz für die Bindung von DCA. Diese Interpretation wurde auch durch NMR-Experimente mit einem Copolymerisat aus ^{15}N Anilin und Coniferylalkohol (Ani-DHP) gestützt, bei dem ebenfalls kein Signal im Verschiebungsbereich von Azomethinen (-40 bis -70 ppm; Berger et al. 1992) erhalten wurde.

Eine weitere Modellverbindung wurde durch Anlagerung von 3,4-Dichloranilin an C- α der aliphatischen Seitenkette von Guajacylglycerol- β -guajacylether, einem Strukturmodell für die β -O-4-Struktureinheit als häufigstem in Ligninen auftretenden Bindungstyp, erhalten. Bei dieser Synthese entstand ein Gemisch von Stereoisomeren mit einem Verhältnis von 80:20 (*threo*/*erythro*). Die beiden Isomere wurden als DCA-Mod 1 (*threo*-Isomer) und DCA-Mod 2 (*erythro*-Isomer) bezeichnet. Der Vergleich der NMR-Spektren des Isomerengemisches mit jenen von DCA-DHP erlaubte die Zuordnung einer Reihe von Signalen, die bei DCA-DHP auftraten und gestattete damit die Bestimmung des Bindungstyps von DCA im Polymer. Durch die Bindung von ^{15}N Anilin an C- α von Guajacylglycerol- β -guajacylether wurden Strukturanaloga zu den entsprechenden DCA-Addukten synthetisiert (Ani-Mod 1; *threo*-Isomer; Ani-Mod 2 *erythro*-Isomer). Das Mengenverhältnis beider Isomere im Polymer betrug wiederum 80:20 (*threo*/*erythro*). Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2 dienten zur weiteren Charakterisierung der chemischen Umgebung von Anilinen in DHPs. Dabei war vor allem die ^{15}N -NMR-Spektroskopie von großem diagnostischem Wert.

Der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von DCA-DHP und Ani-DHP mit Ref-DHP und geeigneten Modellsubstanzen gab erste Hinweise auf den Bindungstyp von DCA in den *in vitro*-Polymeren (Tab. 40 A, B).

Tab. 40. Zuordnung der ^1H -NMR-Signale von DCA-DHP (A) und Ani-DHP (B) durch Vergleich mit Ref-DHP und verschiedenen Modellsubstanzen (d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K).

A						
Zuordnung	δ [ppm] G-B- γ	δ [ppm] G-B- γ (acetyliert)	δ [ppm] (Ref- DHP)	δ [ppm] DCA-Mod 1 (acetyliert)	δ [ppm] DCA	δ [ppm] (DCA-DHP)
Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)	2.49	2.49	2.49	2.49	2.49	2.49
H- γ in 8-O-4-Struktureinheiten	3.61	4.16; 4.25	3.61-3.80	4.05; 4.16	-	3.50-3.80
Aromatische OCH_3 -Gruppen	3.65; 3.66	3.72; 3.75	3.70-3.80	3.70; 3.73	-	3.60-3.80
H-B in 8-O-4-Struktureinheiten	4.31	4.83	4.10	4.66	-	4.10; 4.32
H- α , H- β in versch. Bindungen	-	-	4.60	-	-	-
H- α in 8-O-4-Struktureinheiten	4.73	5.94	4.70	4.83	-	4.73; 4.63
H- α in verschiedenen Bindungen; OH- α in 8-O-4-Struktureinheiten	5.27 (OH- α)	-	5.00	-	-	5.00
H- α in 8-5-Struktureinheiten	-	-	5.48	-	-	5.48
H- β in Coniferylalkohol-Endgruppen	-	-	6.20	-	-	6.20
H- α in Coniferylalkohol-Endgrp.	-	-	6.46	-	-	6.46
H-6 aus DCA	-	-	-	6.64	6.51	6.52
H-2 aus DCA	-	-	-	6.88	6.73	6.59
H-5 aus DCA	-	-	-	7.20	7.16	7.18
sonstige aromatische H-Atome	6.69-7.03	6.84-7.16	6.65-7.10	6.79-7.28	-	6.50-7.10

B					
Zuordnung	δ [ppm] G-B- γ	δ [ppm] (Ref-DHP)	δ [ppm] Ani-Mod 1	δ [ppm] [^{15}N] Anilin	δ [ppm] (Ani-DHP)
Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)	2.49	2.49	2.49	2.49	2.49
H- γ in 8-O-4-Struktureinheiten	3.61	3.61-3.80	3.40; 3.61	-	3.38; 3.60-3.80
Aromatische OCH_3 -Gruppen	3.65; 3.66	3.70-3.80	3.67	-	3.70-3.80
H-B in 8-O-4-Struktureinheiten	4.31	4.30	4.31	-	4.32
H- α , H- β in verschiedenen Bindungen	-	4.60	-	-	4.73
H- α in 8-O-4-Struktureinheiten	4.73	4.70	4.63	-	4.73; 4.63
H- α in verschiedenen Bindungen; OH- α in 8-O-4-Struktureinheiten	5.27 (OH- α)	5.03	-	-	5.03
H- α in 8-5-Struktureinheiten	-	5.48	-	-	5.50
H- β in Coniferylalkohol-Endgruppen	-	6.20	-	-	6.20
H- α in Coniferylalkohol-Endgruppen	-	6.46	-	-	6.46
H-4 aus [^{15}N] Anilin	-	-	6.48	6.62	6.48
H-2; H-6 aus [^{15}N] Anilin	-	-	6.56	6.53	6.57
H-3; H-5 aus [^{15}N] Anilin	-	-	6.90	7.01	6.99
sonstige aromatische H-Atome	6.69-7.03	6.65-7.10	6.79-7.28	-	6.62-7.10

Ein wesentlicher Unterschied der ^1H -NMR-Spektren von DCA-DHP und Ani-DHP im Vergleich mit jenen von Ref-DHP war das Auftreten eines intensiven zusätzlichen Signals im Verschiebungsbereich der aliphatischen H-Atome in den Coniferylalkohol/Xenobiotika-Copolymeren, dessen chemische Verschiebung mit dem Signal für H- α und in den

Modellverbindungen DCA-Mod 1/2 und Ani-Mod 1/2 übereinstimmte. Im Aromatenbereich von DCA-DHP wurde mittels ^1H , ^1H -COSY ein zusätzliches AMX-System, welches auf die Konnektivitäten der H-Atome des DCAs zurückzuführen war, nachgewiesen. Dieses Kopplungssystem zeigte die gleichen Konnektivitätscharakteristika wie die Modellverbindung DCA-Mod 1/2. In Ani-DHP traten zusätzlich zu den aus Ref-DHP bekannten Signalen drei aromatische H-Atom-Gruppen auf, die anhand des Vergleichs mit dem NMR-Spektrum von Ani-Mod 1 als das AA'BB'C-System des an C- α gebundenen Anilins zugeordnet werden konnten. Diese Zuordnungen wurden durch die Analyse der ^{13}C -NMR-Spektren der Polymere und Modellschubstanzen bestätigt. In den Spektren von DCA-DHP und Ani-DHP wurden gegenüber Ref-DHP zwei neue Signale aliphatischer C-Atome detektiert, die durch Vergleich mit den Modellschubstanzen C- α (56.7 ppm) und C- β (84.1 ppm) zugeordnet wurden (Tab. 41). Zusätzlich wurden die aromatischen Signale des an C- α gebundenen DCAs bzw. Anilins im entsprechenden Polymer identifiziert.

Tab. 41. Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale von DCA-DHP (A) und Ani-DHP (B) durch Vergleich mit Ref-DHP und verschiedenen Modellschubstanzen (d_6 -Dimethylsulfoxid bei 303 K).

Zuordnung	δ [ppm] G- β - γ	δ [ppm] (Ref-DHP)	δ [ppm] DCA-Mod 1 (acetyliert)	δ [ppm] DCA	δ [ppm] (DCA-DHP)
Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)	39.5	39.5	39.5	39.5	39.5
C- β in B-5-Struktureinheiten	-	53.0	-	-	53.0
C- β in B- β -Struktureinheiten	-	53.6	-	-	53.6
Aromatische OCH $_3$ -Gruppen	55.5; 55.6	55.7	55.5; 55.7	-	55.5; 55.6
C- γ in B-O-4-Struktureinheiten	60.2	61.6	63.2	-	59.8
C- γ in B-5-, B-O-4 (mit α -C=O)- Struktureinheiten, C- γ in Coniferylalkohol-Seitenketten	-	62.9	-	-	61.6; 62.9
C- γ in B- β - und Dibenzyltetra- hydrofuran-Struktureinheiten	-	70.93	-	-	70.9; 71.0
C- α in B-O-4-Struktureinheiten	71.7	71.2	57.3	-	71.3; 56.7
C- β in B-O-4-, C- α in B- β - Struktureinheiten	83.8	84.9	80.6	-	84.1; 84.9
C- α in B-5-Struktureinheiten	-	86.9	-	-	86.8
C-2 in Guajacyleinheiten	111.3	110.4	112.1	-	109.9; 110.4
C-6 in DCA	-	-	113.2	113.9	113.3
C-2 in DCA	-	-	113.9	114.5	113.8
C-4 in DCA	-	-	117.0	116.0	116.5
C-5 in Guajacyleinheiten	114.6	114.9; 115.1	122.4	-	115.1
C-6 in Guajacyleinheiten	119.6	118.1-119.0	119.5	-	118.1-118.9
C- α und C- β in Coniferylalkohol- Seitenketten	-	128.0-129.3	-	-	128.0-129.7
C-5 in DCA	-	-	130.3	130.4	130.9
C-1 in B-5-Struktureinheiten, C-1 in Coniferylalkohol-Seitenketten	-	129.5-130.5	-	-	?
C-3 in DCA	-	-	131.0	130.9	131.0
C-1 in Guajacyleinheiten	133.3	133.6-135.3	138.5	-	130.2
C-4 in 5-5- und Guajacyl (phenolisch)-Struktureinheiten	145.5	143.4-145.3	138.3	-	143.6
C-1 in DCA	-	-	147.9	149.0	148.2
C-3 (phenolisch) und C-4 in Guajacyl- Struktureinheiten	145.5; 147.0	146.9-148.1	150.6	-	147.0-147.5
C-3 in Guajacyl-Struktureinheiten (C-4 verethert)	149.8	149.1-150.7	150.3	-	150.0

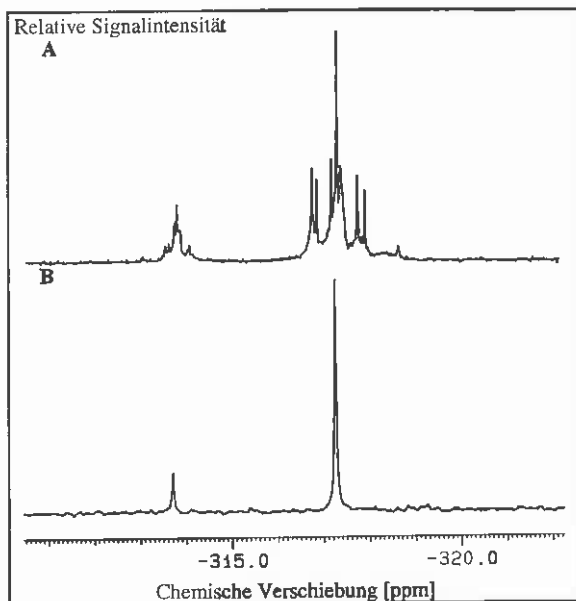
Fortsetzung Tab. 41, Zuordnung ^{13}C -NMR-Signale von Ani-DHP

B

Zuordnung	δ [ppm] G-B- γ	δ [ppm] (Ref.-DHP)	δ [ppm] Ani-Mod 1	δ [ppm] [^{15}N]- Anilin	δ [ppm] (Ani-DHP)
Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)	39.5	39.5	39.5	39.5	39.5
C-8 in B-5-Struktureinheiten	-	53.0	-	-	53.1
C-8 in B-8-Struktureinheiten	-	53.6	-	-	53.5
Aromatische OCH_3 -Gruppen	55.5; 55.6	55.7	55.5; 55.6	-	55.5; 55.7
C- γ in B-O-4-Struktureinheiten	60.2	61.6	59.9	-	59.9
C- γ in B-5-, B-O-4 (mit $\alpha\text{-C=O}$)- Struktureinheiten, C- γ in Coniferylalkohol-Seitenketten	-	62.9	-	-	61.6
C- γ in B-8- und Dibenzyltetrahydrofuran- Struktureinheiten	-	70.93	-	-	-
C- α in B-O-4-Struktureinheiten	71.7	71.20	56.7 (d)	-	71.0; 56.7
C-8 in B-O-4-, C- α in B-8- Struktureinheiten	83.8	84.9	84.3	-	84.9; 84.3
C- α in B-5-Struktureinheiten	-	86.9	-	-	86.9
C-2 in Guajacyleinheiten	111.3	110.4	111.5	-	111.6
C-2, C-6 in [^{15}N] Anilin	-	-	113.1	114.6	113.1
C-4 in [^{15}N] Anilin	-	-	114.9	117.0	115.0
C-5 in Guajacyleinheiten	114.6	114.9; 115.1	115.0	-	115.2
C-6 in Guajacyleinheiten	119.6	118.1-119.0	117.2	-	118.1-119.0
C- α und C-8 in Coniferylalkohol- Seitenketten	-	128.0-129.3	-	-	128.0-129.3
C-3, C-5 in [^{15}N] Anilin	-	-	128.6	129.2	128.7
C-1 in B-5-Struktureinheiten, C-1 in Coniferylalkohol-Seitenketten	-	129.5-130.5	-	-	130.5-131.2
C-1 in Guajacyleinheiten	133.3	133.6-135.3	132.0	-	132.2
C-4 in 5-5- und Guajacyl (phenolisch)- Struktureinheiten	145.5	143.4-145.3	145.3	-	143.8
C-3 (phenolisch) und C-4 in Guajacyl- Struktureinheiten	145.5; 147.0	146.9-148.1	147.3	-	146.9-147.5
C-1 in [^{15}N] Anilin	-	-	148.0 (d)	148.3	148.0
C-3 in Guajacyl-Struktureinheiten (C-4 verethert))	149.8	149.1-150.7	150.1	-	150.1

Die zwei im ^{15}N -NMR-Spektrum von Ani-DHP auftretenden Signalgruppen hatten die exakt gleiche chemische Verschiebung wie die ^{15}N -Signale der Modellsubstanzen Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2 (Abb. 85). Somit konnte das Verhältnis der vorkommenden stereochemischen Konformationen an den mit [^{15}N] Anilin substituierten aliphatischen Seitenketten der B-O-4-Bindungen im Polymer quantitativ bestimmt werden. In Ani-DHP lag der Anteil des *threo*-Isomers bei 85-90 %, während das *erythro*-Isomer zu 10-15 % vorkam. Weitere Bindungstypen von Anilin waren in Ani-DHP nicht nachzuweisen.

Abb. 85. Vergleich der ^{15}N -NMR-Spektren von (A) Ani-DHP und (B) Ani-Mod 1/2.



4. Untersuchungen zur chemischen Stabilität der Bindung von Anilinen in DHPs und Modellsubstanzen

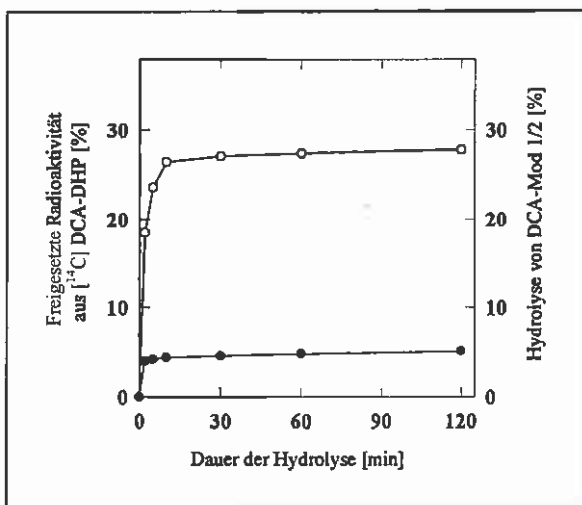
Zur Überprüfung der Bioverfügbarkeit „nicht-extrahierbarer Rückstände“ von Xenobiotika in Nahrungspflanzen werden im allgemeinen Tierversuche mit Nagern durchgeführt (Esser 1986; Khan et al. 1987). Sandermann et al. (1992) konnten zeigen, daß die Bioverfügbarkeit solcher Rückstände von 3,4-Dichloranilin in Weizenpflanzen 10-20 % betrug, wenn diese an Schafe oder Ratten verfüttert wurden. Die Freisetzung der inkorporierten Radioaktivität von DCA erreichte unter hydrolytischen Bedingungen (0.1 M HCl, 37°C), die das Milieu im Säugermagen simulieren sollten, einen ähnlichen Wert (ca. 10 % in zwei Stunden). Dieses experimentelle Modell („simulierter Magen“) fand auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei der Charakterisierung der chemischen Stabilität der Bindung von Anilinen in DHPs Verwendung.

Die Hydrolyse des [^{14}C] 3,4-Dichloranilin-Coniferylalkohol-Copolymers ([^{14}C] DCA-DHP) in 0.1 M HCl bei 37°C führte zu einer raschen Freisetzung der Radioaktivität in die saure wäßrige Phase (Abb. 86). Etwa 5 min nach Hydrolysebeginn befanden sich ca. 25 % der Radioaktivität im Überstand nach Zentrifugation. In den nachfolgenden zwei Stunden gingen weitere 2-3 % der Radioaktivität in die wäßrige Phase über. Die Hydrolysekinetik einer Modellschubstanz für den Bindungstyp von DCA in DHPs (Stereoisomerengemisch DCA-

Modellsubstanz für den Bindungstyp von DCA in DHPs (Stereoisomerengemisch DCA-Mod 1/2) wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen über die Quantifizierung der gebildeten Hydrolyseprodukte ermittelt (Abb. 86). Die Menge an Modellsubstanz wurde während der ersten 5 min der Hydrolyse um ca. 3 % reduziert, während die Menge der entsprechenden Hydrolyseprodukte (Guajacylglycerol- β -guajacylether und DCA; s. II. 16) im gleichen Maße zunahm. Nach 24-stündiger Inkubation wurde eine Hydrolyserate von 9 % ermittelt.

Abb. 86. Milde saure Hydrolyse (0.1 M HCl, 37°C) von [14 C] DCA-DHP und DCA-Mod 1/2. Symbole:

○ Freisetzung der Radioaktivität aus [14 C] DCA-DHP;
● Abnahme der Konzentration von DCA-Mod 1/2 (Quantifizierung mittels HPLC).



Die während der Hydrolyse von [14 C] DCA-DHP in der sauren wässrigen Phase auftretende Radioaktivität war nach Maßgabe der HPLC mit Dioden-Array- und Radioaktivitätsdetektion auf die Freisetzung von DCA zurückzuführen (Abb. 87). Das UV-Spektrum der einzeln detektierten niedermolekularen Substanz entsprach exakt jenem von DCA.

Zusätzlich zur Hydrolysekinetik wurde die pH-Stabilität von [14 C] DCA-DHP und der Modellsubstanz bei Raumtemperatur ermittelt. Dabei wurde jeweils 10 min bzw. 24 h in einem Puffer des entsprechenden pH-Wertes inkubiert. Für [14 C] DCA-DHP wurde wiederum die freigesetzte Radioaktivität im Überstand nach Zentrifugation gemessen, während für die Modellsubstanz die Abnahme der Konzentration mittels HPLC quantifiziert wurde (Abb. 88). [14 C] DCA-DHP war zwischen pH 5 und pH 9 recht hydrolysebeständig und die Hydrolysekurven für 10 min bzw. 24 h Inkubation unterschieden sich nur unwesentlich. Für pH 11 und pH 12 wurde eine rasche Freisetzung der Radioaktivität ermittelt (nach 10 min 35 % bei pH 11, 63 % bei pH 12). Dieser Wert änderte sich durch eine weitere Inkubation von 24 h nur noch geringfügig. Bei pH-Werten < 2 wurden in 10 min ca. 25 %, in 24 h ca. 40 % der

Radioaktivität freigesetzt. Die Modellsubstanz zeigte sich deutlich weniger Hydrolyseempfindlich. Nur bei stärker saurem pH ($\text{pH} < 2$) wurde innerhalb der ersten 10 min der Inkubation eine Abspaltung von DCA beobachtet. Nach 24 h waren 15 % des DCAs bei pH 1, 6 % bei pH 2 und 2 % bei pH 12 hydrolysiert.

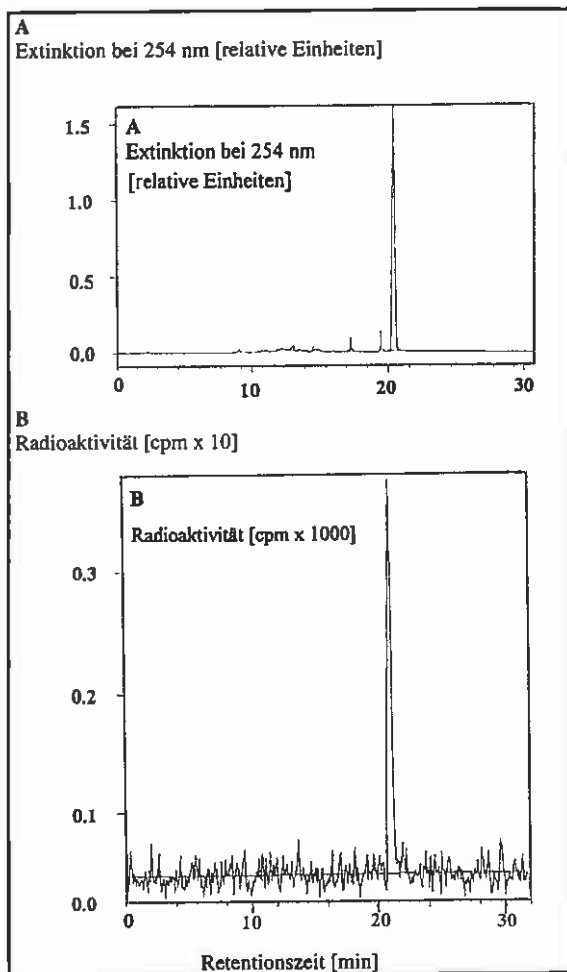
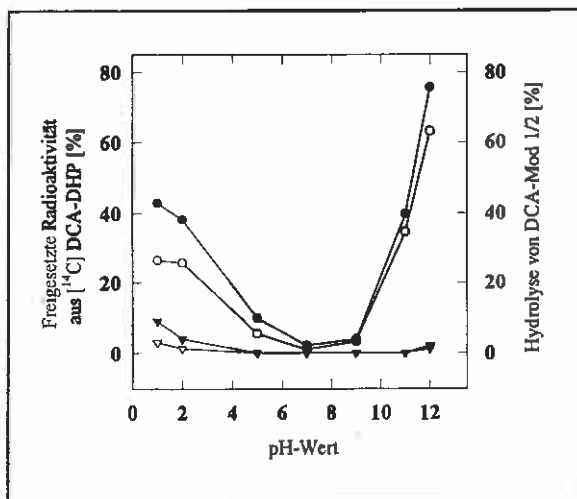


Abb. 87. HPLC-Chromatogramm der sauren wässrigen Phase nach Hydrolyse von [^{14}C] DCA-DHP in 0.1 M HCl bei 37°C. (A) Detektion bei 254 nm, (B) Radioaktivitäts-Detektion.

Abb. 88. pH-Stabilität von $[^{14}\text{C}]$ DCA-DHP und DCA-Mod 1/2 bei 23°C. Quantifizierung aus Freisetzung der Radioaktivität aus $[^{14}\text{C}]$ DCA-DHP bzw. Freisetzung von DCA aus DCA-Mod 1/2 in der HPLC. Symbole: $[^{14}\text{C}]$ DCA-DHP
 ○ 10 min Inkubation
 ● 24 h Inkubation
 DCA-Mod 1/2
 ◊ 10 min Inkubation
 ▼ 24 h Inkubation.



Wegen der großen Diskrepanz der mit $[^{14}\text{C}]$ DCA-DHP und der Modellsubstanz erhaltenen Resultate wurde überprüft, ob die Freisetzung der Radioaktivität aus dem Polymer möglicherweise auf dessen verbesserte Löslichkeit bei extremen pH-Werten zurückzuführen ist. Dazu wurde die saure wässrige Phase nach 5 min Hydrolyse in 0.1 M HCl bei 37°C vom ungelösten Polymer durch Zentrifugation abgetrennt (5 min Tischzentrifuge; Hettich, Tuttlingen), mit 0.1 M NaOH neutralisiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (Rotavapor, Büchi, Flawil, Schweiz) entfernt. Der Rückstand wurde in 100 µl Dimethylformamid aufgenommen und mittels HPSEC die Molekulargewichtsverteilung bestimmt (Abb. 89). Die wässrige Phase enthielt, neben DCA, einen wesentlichen Anteil einer polymeren Komponente. Die Radioaktivität war über den gesamten im UV-Kanal detektierten Molekulargewichtsbereich verteilt. Im Radioaktivitätskanal betrug das Verhältnis Polymer zu DCA ca. 1 : 1. Die wässrige Phase einer bei pH 12 für 10 min inkubierten Probe von $[^{14}\text{C}]$ DCA-DHP enthielt ausschließlich polymere Bestandteile. Die Kinetik der Hydrolyse von $[^{14}\text{C}]$ DCA-DHP wie sie in Abb. 86 gezeigt ist, beruhte also auf einer Überlagerung zweier Effekte, nämlich der Freisetzung von $[^{14}\text{C}]$ DCA und der Löslichkeit des Polymers in 0.1 M HCl.

Die Hydrolyse eines Coniferylalkohol/ $[^{15}\text{N}]$ Anilin-Copolymers in $\text{D}_2\text{O}/d_6\text{-DMSO}$ 2:1 (v/v) bei pH 1.0 (pH-Einstellung mit DCl) und 37°C wurde im NMR-Spektrometer mittels ^1H -NMR-Spektroskopie verfolgt (Abb. 90). Dabei wurde die Bildung von protoniertem $[^{15}\text{N}]$ Anilin quantifiziert. Die dafür nötige Integration wurde dadurch vereinfacht, daß die Signale

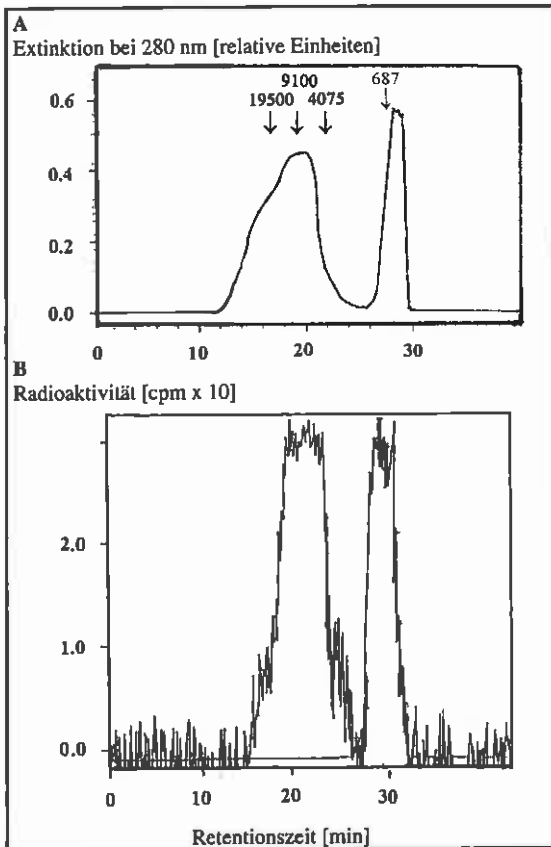


Abb. 89. HPSEC-Chromatogramm der sauren wäßrigen Phase nach Hydrolyse von [^{14}C] DCA-DHP in 0.1 M HCl bei 37°C. (A) Detektion bei 280 nm, (B) Radioaktivitäts-Detektion. Die Retentionszeiten der Molekulargewichtsstandards sind mit Pfeilen markiert.

von protoniertem Anilin bei tieferem Feld erschienen, als sämtliche H-Atome des Polymers. Die Zuordnung dieser Signale gelang durch Vergleich der NMR-Spektren mit jenen des protonierten [^{15}N] Anilin-Standards (gleiche Bedingungen wie oben) und durch Analyse der Kreuzsignale im ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum (H-2, H-6: 7.34 ppm; H-4: 7.40 ppm; H-3, H-5: 7.45 ppm). Unter Berücksichtigung einer Einbaurate von 40-50 Mol % [^{15}N] Anilin im Polymer bei Synthesebedingungen mit äquimolaren Substrat-Konzentrationen (Coniferylalkohol und [^{15}N] Anilin) wurde eine Freisetzung von 14-18 % des [^{15}N] Anilins nach 10 min, von 20 % nach 3 h und von 44 % nach 3 d bestimmt. Demnach erfolgte zunächst eine recht rasche Hydrolyse in den ersten 10 min, deren Geschwindigkeit sich mit zunehmender Hydrolyse-Dauer deutlich verlangsamt.

Demnach war die Kinetik der Radioaktivitäts-Freisetzung aus [^{14}C] DCA-DHP in 0.1 M HCl bei 37°C das Produkt zweier sich überlagernder Phänomene. Zum einen akkumulierte

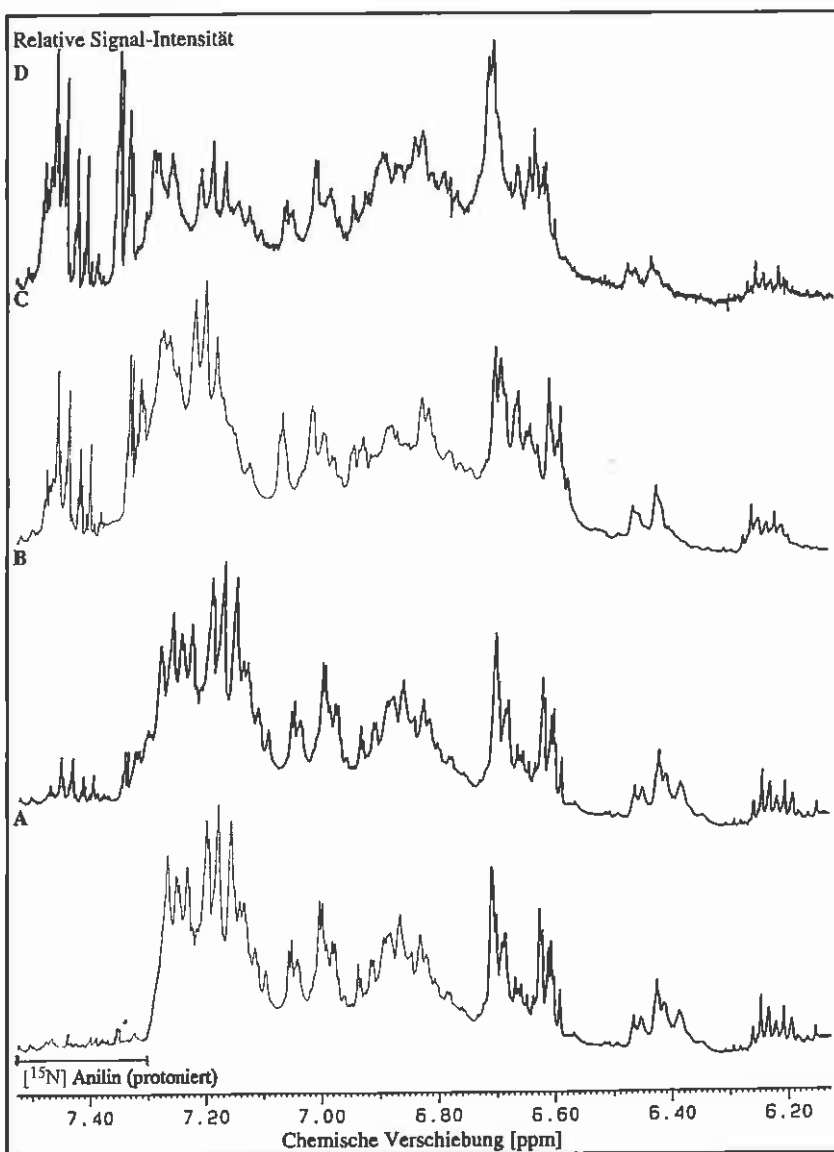


Abb. 90. ^1H -NMR-Spektrum von Ani-DHP während einer Hydrolyse in $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 2:1 (v/v) bei pH 1.0 (pH-Einstellung mit DCl) und 37°C . (A) Ani-DHP vor der Hydrolyse, (B) Reaktionsmischung nach 10 min Hydrolyse, (C) nach 3 h Hydrolyse, (D) nach 2 d Hydrolyse. Die Signale des freigesetzten protonierten [^{15}N] Anilins erscheinen zwischen 7.30 und 7.48 ppm.

hydrolysiertes DCA in der wäßrigen Hydrolyselösung und zum anderen zeigte das Polymer eine gewisse Löslichkeit unter obigen Bedingungen. Laut Radio-HPLC war 5 min nach Hydrolysebeginn ca. 50-60 % der Radioaktivität in der Hydrolyselösung auf die Löslichkeit des Polymers zurückzuführen. Die Quantifizierung der [^{15}N] Anilin-Freisetzung aus Ani-DHP mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ergab unter identischen Bedingungen nach 10 min eine Hydrolyserate von 14-18 %. Unter Berücksichtigung des in den ersten 10 min der Hydrolyse freigesetzten Radioaktivitätsanteils von ca. 25 % (Quantifizierung im Szintillationszähler) aus [^{14}C] DCA-DHP läßt sich abschätzen, daß 50-60 % davon auf einer [^{14}C] DCA-Freisetzung und 40-50 % auf der Löslichkeit des Polymers in der Hydrolyselösung basieren. Die Kinetik der Hydrolyse von [^{14}C] DCA-DHP wies zwei Phasen auf, nämlich eine rasch erfolgende Akkumulation von Radioaktivität in der wäßrigen Hydrolyselösung in den ersten 10 min der Hydrolyse, gefolgt von einer langsameren Radioaktivitäts-Freisetzung. Diese Beobachtung ist auf den ersten Blick nicht konform mit der Homogenität der Bindung von DCA in DCA-DHP und [^{15}N] Anilin in Ani-DHP (s. III 3.2.3). Wie durch Hydrolyse der Modellverbindung für die in den DHPs vorliegende Benzylamin-Bindung der Aniline gezeigt wurde, ist eine sehr langsame hydrolytische Spaltung dieser Bindung zu erwarten. Diese Diskrepanz in der Labilität der Bindung von Anilinen in DHPs und in den entsprechenden Modellsubstanzen kann möglicherweise mit dem Vorliegen eines Nachbargruppen-Effektes erklärt werden. Dieser Interpretationsansatz wird unter IV 3. ausführlich diskutiert.

IV. DISKUSSION

Bei der Erforschung der Wirkung von **Umweltschadstoffen** auf Pflanzen sind mechanistische Untersuchungen pflanzlicher **Streßreaktionen** und Abwehrmechanismen von besonderem Interesse. Als eine solche Abwehrreaktion ist die **Lignifizierung** von Gewebe, ein wesentlicher Bestandteil der sogenannten **hypersensitiven Reaktion** von Pflanzen bei Pathogenbefall, anzusehen. Die Inkrustierung von Ligninen in die pflanzliche Zellwand stellt gegenüber Schadorganismen eine chemische und mechanische Barriere dar. Des weiteren ist die Einlagerung von Fremd- und Naturstoffen in ligninartige Polymere eine wichtige pflanzliche Detoxifizierungsstrategie. Auf diese Weise wirken die **Lignine als Senke für Xenobiotika**. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ligninbildung und die Inkorporation xenobiotischer Chemikalien in Lignine als biochemische Reaktionen von Pflanzen auf biotische und xenobiotische Umwelteinflüsse anhand zweier Modellsysteme untersucht:

- Elicitorinduzierte Ligninbildung in Fichten-Suspensionskulturen und Effekt von Ozon auf die Akkumulation phenolischer Polymere in Fichten-Keimlingen
- Bindungstyp von 3,4-Dichloranilin in Dehydrierungspolymerisaten (DHPs) und Hydrolyseempfindlichkeit dieser Bindung

1. Elicitor-induzierte Lignifizierung in Fichten-Suspensionskulturen

In Versuchen mit mixotrophen Suspensionskulturen der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst) wurde von Meßner und Boll (1993) eine erhöhte Aktivität verschiedener Enzyme der Lignin-Biosynthese nach Behandlung mit einer Elicitorpräparation des Nadelpathogens *Rhizosphaera kalkhoffii* und die nachfolgende Akkumulation eines ligninartigen Materials im Kulturmedium beschrieben. Diese Studien zur Induktion der Lignin-Biosynthese wurden durch die ausführlichen Arbeiten zur Induktion der Enzym-Aktivität (Galliano et al. 1993 a) und der mRNA-Transkript-Menge (Galliano et al. 1993 b) von Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) ergänzt. Da eine detaillierte Beschreibung der Struktur von Ligninen, die nach Verwundung oder Pathogenbefall von Pflanzen gebildet werden, bisher nicht publiziert ist, sollte in dieser Arbeit eine Strukturaufklärung des Lignins aus Fichten-Suspensionskulturen dazu dienen, diese wichtige Wissenslücke zu schließen. Begleitend sollten Untersuchungen zur Biosynthese dieses ligninartigen Materials unternommen werden, wobei vor allem synthetische Bedingungen für die Bildung solcher „**Streß-Lignine**“ beschrieben werden sollten.

Zunächst wurden verschiedene photometrische und spektroskopische Methoden für die Klassifizierung des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen als ligninartig eingesetzt. Durch Anfärbung ligninspezifischer Bestandteile des Polymers mit dem Phloroglucinol/HCl-Reagens und durch Reaktion mit Thioglycolsäure mit anschließendem Nachweis der gebildeten Lignin-Thioglycolat-Derivate wurden erste Hinweise auf die ligninartige Natur des Polymers erhalten. Bei der ^1H -Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie wurden die für Lignine typischen Signale erhalten. Für die eindeutige Zuordnung der auftretenden Strukturbausteine im Polymer wäre die Aquirierung eines ^{13}C -NMR-Spektrums unbedingt erforderlich gewesen. Diese Technik verlangt eine gegenüber der ^1H -NMR-Spektroskopie deutlich größere Probenmenge. Wegen der geringen Löslichkeit des Polymers in sämtlichen gängigen NMR-Lösungsmitteln konnten allerdings keine hochaufgelösten ^{13}C -NMR-Spektren erhalten werden. Als eine Technik für die Strukturaufklärung an Festkörpern wurde die Fourier-Transformations-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie verwendet. Diese Methode läßt Aussagen über die Zusammensetzung eines Polymers und das Vorkommen bestimmter funktioneller Gruppen zu, eignet sich jedoch nicht für die Aufklärung von Bindungstypen im Polymer. Der Vergleich des FT-IR-Spektrums von ligninartigem Material aus den Suspensionskulturen mit Milled-Wood-Lignin, welches durch Extraktion und Mahlen von Holz über einen längeren Zeitraum in einer Kugelmühle gewonnen wurde, ergab weitgehende Übereinstimmung im Vorkommen charakteristischer Gruppenfrequenzen. Diese traten jedoch mit einer deutlich verschiedenen Intensitätsverteilung auf.

1.1 Ligninstruktur

Als Methode der Wahl für die detaillierte Beschreibung der im Polymer auftretenden Monolignole, deren Bindungstypen und die intermolekularen Verknüpfungen der Einzelbausteine erwies sich die Thioacidolyse. Diese Lignin-Abbaumethode ist eine Solvolyse in Ethanthiol und Bortrifluorid, bei der selektiv die β -O-4-Bindung, der häufigste in Ligninen vorkommende Bindungstyp, gespalten wird. Die Reaktionsmischung nach Thioacidolyse des extrazellulären Polymers aus Fichten-Suspensionskulturen enthielt einen erheblichen Anteil monomerer und dimerer Abbauprodukte, welche nach Derivatisierung mittels einer Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert wurden.

Monolignol-Zusammensetzung

Die mittels Thioacidolyse erhaltenen strukturellen Daten zeigen deutliche Unterschiede zwischen dem extrazellulären Polymer aus den Fichten-Suspensionskulturen (ECL) und Holz-lignin von Fichte (SWL) auf. Der recht hohe Anteil an *p*-Hydroxyphenyl (H)-Einheiten, der aus der Verwendung von *p*-Cumarylalkohol als Monolignol stammt, gibt zu der Vermutung Anlaß, daß die Biosynthese des Zellkultur-Polymers Parallelen zur Bildung von sogenannten *de novo*-Ligninen aufweist. Nach Maßgabe mikroanalytischer und autoradiographischer

Tab. 42. Zusammenstellung von Literaturzitaten zum Gehalt von p-Hydroxyphenyl (H)-Einheiten in Koniferen-Ligninen (in % der Guajacyl (G)-Einheiten).

Spezies	Ausbeute H-Einheiten [% G]	Methode der Quantifizierung	Literatur
Lignine der Mittellamelle			
<i>Picea mariana</i>	40 % weniger OMe-Gruppen	Infrarot-Spektroskopie	[1]
<i>Picea abies</i>	6 %	Pyrolyse	[2]
<i>Pinus thumbergii</i>	n.q.	Nitrobenzol-Oxidation Mikroautoradiographie	[3]
Lignine der Nadeln und Hypokotyle von Keimlingen			
<i>Picea abies</i> (Nadeln)	6 %	KMnO ₄ -NaIO ₄ -Oxidation	[4]
<i>Pinus sylvestris</i> (Nadeln)	7 %	KMnO ₄ -NaIO ₄ -Oxidation	[4]
<i>Picea abies</i> (Nadeln)	9 %	Thioacidolyse	[5]
<i>Picea abies</i> (Hypokotyle)	9 %	Thioacidolyse	[5]
Holz lignine			
<i>Picea abies</i> (Holz)	1-2 %	Nitrobenzol-Oxidation	[6]
<i>Picea abies</i> (Holz)	1-2 %	Thioacidolyse	[7]
<i>Pinus sylvestris</i> (Holz)	1-2 %	Nitrobenzol-Oxidation	[6]
<i>Pinus pinaster</i> (Holz)	2 %	Thioacidolyse	[7]
<i>Picea abies</i> (Kompressionsholz)	15 %	Nitrobenzol-Oxidation	[8]
<i>Pinus thumbergii</i> (Kompressionsholz)	18 %	Nitrobenzene oxidation	[9]
<i>Pinus pinaster</i> (Kompressionsholz)	21 %	Thioacidolyse	[7]
<i>Ginkgo biloba</i> (Kompressionsholz)	9 %	Nitrobenzol-Oxidation	[10]
Zellkultur-Lignine			
<i>Pinus taeda</i>	19 %	Nitrobenzol-Oxidation	[11]
<i>Pinus banksiana</i> (Elicitor-Zugabe)	36 %	Nitrobenzol-Oxidation	[12]
<i>Pinus taeda</i>	17 %	Thioacidolyse	[13]
<i>Picea abies</i>	10 %	Thioacidolyse	[14]
<i>Picea abies</i> (Elicitor-Zugabe)	19 %	Thioacidolyse	[5]

Verwendete Abkürzungen: n.q., nicht quantifiziert.

Literatur: [1], Whiting und Goring (1982); [2], Sorvari et al. (1986); [3], Terashima und Fukushima (1988); [4], Miksche und Yasuda (1977); [5], vorliegende Doktorarbeit; [6], Sarkanen und Hergert (1971); [7], Lapierre (1993); [8], Westermark (1985); [9], Fukushima und Terashima (1991 a); [10], Fukushima und Terashima (1991 b); [11], Fukuda et al. (1988); [12], Campbell und Ellis (1992); [13], Eberhardt et al. (1993); [14], Brunow et al. (1993).

Die hier vorgestellten Resultate betreffend eines elicitorinduzierten ligninartigen Polymers unterstreichen die Ähnlichkeit zu den Ligninen der frühen Entwicklungsstufen in Koniferen (Tab. 42). Zu dieser Gruppe gehören sämtliche Zellkultur-Lignine, wobei es unerheblich ist, ob diese als Reaktion der Zellen auf eine besondere Zusammensetzung des Kulturmediums oder auf eine Elicitor-Zugabe gebildet werden. Diese Einschätzung wird durch das folgende Experiment gestützt: Für eine Fichten-Suspensionskultur wurde kürzlich gezeigt, daß, wenn die Zellen unter speziellen Bedingungen kultiviert wurden, ein ligninartiges Polymer in das Kulturmedium sekretiert wurde (Simola et al. 1992), welches einen hohen Gehalt an H-Einheiten aufwies (Brunow et al. 1993). Die für diese Kultur beschriebenen Wachstumsfaktoren führten auch in der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellkultur zur

Ligninbildung, auch wenn kein Elicitor zugegeben wurde (Glatzel 1995). Des weiteren waren Elicitor-Präparationen von Mykorrhiza-Pilzen und sogar Bäcker-Hefe ebenso aktiv in der Lignin-Induktion wie der routinemäßig verwendete Elicitor aus dem Nadelpathogen *Rhizosphaera kalkhoffii* (Glatzel et al. 1993; G. Bahnweg, persönliche Mitteilung). Ein hoher Gehalt an H-Einheiten (ca. 8-9 %) wurde im Rahmen der hier präsentierten Arbeit auch für Nadeln und Hypokotyle junger Fichten-Keimlinge (Alter 6-9 Wochen) ermittelt. Ein ähnlicher Wert (6-7 %) wurde auch von Miksche und Yasuda (1977) in den Nadeln von Koniferenkeimlingen durch eine oxidative Abbaumethode ermittelt.

Die regulatorischen Prozesse, die zum bevorzugten Einbau von *p*-Cumarylalkohol in *de novo* gebildete Lignine führt, sind bis dato unbekannt. Generell ist zu vermuten, daß eine starke Induktion der Lignin-Biosynthese zu einem kompletten Verbrauch des zellulären Pools an Coniferylalkohol und dessen Vorläufern (z.B. Feruloyl-CoA) führt. Da einige der wesentlichen Enzyme der Monolignol-Synthese, nämlich Cinnamoyl-CoA-Ligase (Lüderitz et al. 1982), Cinnamoyl-CoA-Reduktase (Lüderitz und Grisebach 1981) und CAD (Lüderitz und Grisebach 1981; Galliano et al. 1993 a) auch die *p*-Cumaroylderivate umsetzen, wird im Falle eines kompletten Verbrauchs der Feruloylderivate wahrscheinlich dieser Pool für die Lignin-Synthese verwendet. Diese Hypothese ist konsistent mit dem häufigen Auftreten von H-Einheiten in sämtlichen bisher untersuchten Gymnospermen- und Angiospermen-*de novo*-Ligninen, deren Synthese entweder durch Differenzierungs- oder Streß-Signale angeregt sein kann. Zusätzlich mag auch ein spezifischerer regulatorischer Effekt auf der Ebene von Enzymaktivitäten existieren. Die von Kneusel et al. (1989) beschriebene Stimulation der *p*-Cumaroyl-CoA-3-Hydroxylase-Aktivität durch eine Elicitor-vermittelte Acidifizierung des Cytosols würde jedoch nach den dort beschriebenen Daten zu einer vermehrten Synthese von Feruloyl-Derivaten führen und vermag damit nicht zur Erklärung der hier vorgestellten Ergebnisse dienen.

Quervernetzung der Ligninbausteine

Die Zusammensetzung der dimeren Produkte nach Thioacidolyse zeigte weitere Unterschiede zwischen ECL und SWL auf. ECL enthielt, im Vergleich mit SWL, einen höheren Anteil an Dimeren, die aus Pinoresinol (β - β)-Einheiten stammten und einen deutlich geringeren (ca. 30 %) Anteil von Diarylpropan (β -1)-Struktureinheiten. Ähnliche Resultate wurden bei der Thioacidolyse von Dehydrierungspolymerisaten (DHPs), die durch oxidative Polymerisation von Monolignolen *in vitro* gewonnen werden, erhalten (Tollier et al. 1991). Allerdings wurden auch klare strukturelle Unterschiede zwischen ECL und DHP festgestellt, so z.B. ein höherer Anteil von Biphenyl (5-5)-Strukturen und ein geringerer Anteil von β -5-Dimeren in ECL. Daraus kann geschlossen werden, daß ECL in Hinsicht auf quervernetzende Strukturbausteine eine Mittelposition zwischen den Holzligninen von Gymnospermen und synthetischen DHPs einnimmt. Die recht niedrige Ausbeute monomerer Thioacidolyse-

Produkte und der relativ höhere Anteil von Thioacidolyse-Dimeren lassen annehmen, daß ECL ein stark verzweigtes Polymer mit einem hohen Prozentsatz von C-C-verknüpften Einzelbausteinen ist. Diese Eigenschaft wurde ebenfalls für die Lignine der Mittellamelle in den frühen Stadien der Zellwand-Differenzierung beschrieben (Fukushima und Terashima 1990; Eom et al. 1987). In Analogie zu der von Higuchi (1985) für Kompressionsholz gewählten Beschreibung könnte ECL in einer Art „Zulaufverfahren“ (rasche Zugabe der Substrate bei der Synthese von DHPs; Freudenberg 1968) mit hohen lokalen Monolignol-Konzentrationen entstehen. Die Ausschleusung der Substrate aus den Zellen erfolgt dabei möglicherweise über Vesikel (Brunow et al. 1993; Sandermann 1994). Der relative Gehalt der verschiedenen Bindungstypen in Ligninen von Fichten-Keimlingen, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, unterschied sich von jenem in Fichtenholz durch ein vermehrtes Vorkommen von 8-5- und einen geringeren Anteil von 5-5-Struktureinheiten. Dieser Befund stützt die Hypothese, daß Lignine in differenzierenden Geweben strukturelle Unterschiede zum ausdifferenzierten Holz aufweisen. Die deutlichen Unterschiede bezüglich der quervernetzenden Strukturen in ECL und Keimlingen gegenüber SWL spiegeln möglicherweise die spezifischen physiko-chemischen Faktoren wieder, die den Polymerisationsprozeß regulieren. Dabei spielen so unterschiedliche Variablen wie pH-Wert, Wassergehalt des Gewebes, Matrix-Effekte, lokale Konzentration der Monolignole oder Katalyse durch spezifische Peroxidasen, Phenoxidasen und Laccasen eine Rolle.

1.2 Der Lignin/Extensin-Komplex

Der Protein-Gehalt von ECL betrug nach Maßgabe einer Rechnung aus dem mittels Elementaranalyse ermittelten Stickstoffgehaltes ca. 32 %. Eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung ergab, daß das Polymer hohe Anteile an Prolin (ca. 12 %) und Hydroxyprolin (ca. 30 %) enthält. Diese Strukturmerkmale deuten auf eine Ähnlichkeit des Proteinanteils von ECL mit Extensinen (hydroxyprolinreiche Glycoproteine der pflanzlichen Zellwand) hin. Extensine wurden als konstitutive strukturelle Bestandteile von Primärwänden (Lamport 1960; Whitmore 1982) und Koniferenholz (Bao et al. 1992) beschrieben. Des weiteren wurde gezeigt, daß Extensine während phytopathologischer Abwehrreaktionen (Showalter 1993) und nach Ozon-Behandlung (Schneiderbauer et al. 1990) induziert werden. Es wird angenommen, daß Extensine während der Wirt-Pathogen-Interaktion durch einen Peroxidase/H₂O₂-vermittelten oxidativen Prozeß (Bradley et al. 1992) quervernetzt und insolubilisiert werden. Whitmore (1978) beobachtete die durch Peroxidase katalysierte Bindung von Lignin-Vorstufen an Hydroxyprolin-reiche Proteine und vermutete daraus, daß Extensine im Holz an Lignin-artiges Material gebunden sind. Moore (1973) beschrieb einen extrazellulären Lignin/Extensin-Komplex, der in Soja-Suspensionskulturen in das Kulturmedium sekretiert wurde. Der Nachweis eines Kohlenhydratanteils von ca. 14 % in ECL (w/w) und die schlechte hydrolytische Zugänglichkeit der Polysaccharide weisen auf das

Vorkommen der für pflanzliche Sekundärwände typischen Lignin-Kohlenhydrat-Quervernetzungen hin (Iiyama et al. 1994). Mittels Polarisationsmikroskopie konnte gezeigt werden, daß in ECL keine kristallinen Bereiche, die in Zellwänden meist auf Cellulosefibrillen zurückzuführen sind, auftreten.

1.3 Lignin-Biosynthese

Die Lignin-Biosynthese in Fichten-Suspensionskulturen wurde im wesentlichen auf zwei Ebenen untersucht: 1.) Die für die Polymerisation der Monolignole benötigten Enzyme in der Zellkultur sollten nachgewiesen und deren Lokalisation beschrieben werden. Da das ligninartige Polymer der Zellkulturen im Medium akkumuliert, wäre eine intrazelluläre Synthese von Lignin-Oligomeren und deren anschließende Sekretion in das Kulturmedium oder eine Sekretion der Monolignole in das Medium und die dortige Polymer-Synthese denkbar. 2.) Durch Variation der Bedingungen während der Synthese von Dehydrierungspolymerisaten (DHPs) sollte erlassen werden, welche synthetischen Voraussetzungen (Substratkonzentrationen, Enzymzusammensetzung, pH-Wert u.ä.) für die Angleichung der strukturellen Eigenschaften an jene von ECL nötig sind.

Lokalisation der Enzyme für die Lignin-Polymerisation

Bisher sind die enzymatischen Reaktionen, die an den letzten Schritten der Lignifizierung beteiligt sind, nicht gänzlich geklärt. Die Bildung von Phenoxy-Radikalen, die spontan polymerisieren, wurde eine lange Zeit vor allem einer Katalyse durch Peroxidasen zugeschrieben (Harkin und Obst 1973), während in den letzten Jahren zusätzlich auch Phenoloxidasen (*o*-Diphenol:O₂-Oxidoreduktasen; Savidge und Udagama-Randeniya 1992) und Laccasen (*p*-Diphenol:O₂-Oxidoreduktasen) wieder eine bedeutendere Rolle bei der Ligninbildung zugesprochen wird (Sterjiades et al. 1992; Bao et al. 1993; O'Malley et al. 1993). Schon Freudenberg (1968) betonte, daß Laccasen ebenso wie Peroxidasen gleichermaßen befähigt sind, bei Zugabe der entsprechenden Substrate *in vitro* Polymere zu erzeugen. Wegen der geringen Spezifität einer gereinigten Laccase aus Platanen-Suspensionskulturen gegenüber phenolischen Substraten mit mehr als zwei aromatischen Ringen wurde von Sterjiades et al. (1993) vermutet, daß die Laccase ihre Funktion *in vivo* während der frühen Stadien der Ligninsynthese hat. Die Fähigkeit dieser Laccase zur Oxidation von *p*-Cumarylalkohol als zweitem Substrat für den Aufbau ligninartiger Polymere war äußerst gering. Eine Rolle von Laccase bei der Synthese von „Streß-Ligninen“, die einen höheren Anteil von *p*-Cumaryl-Einheiten aufweisen, wurde deshalb von den Autoren als recht unwahrscheinlich bezeichnet. In den elicitorinduzierten Fichten-Suspensionskulturen konnte weder zellulär, noch zellwandgebunden oder extrazellulär Aktivitäten von Phenoloxidase oder Laccase, auch bei Verwendung verschiedener potentieller Substrate (Syringaldazin, Guajacol, *p*-Phenylendiamin, 2,7-Diaminofluoren, Pyrogallol, Coniferylalkohol), nachgewiesen werden. Nach

Elicitor-Behandlung der Fichten-Suspensionskulturen wurde eine Induktion der Aktivität zellulärer und ionisch an die Zellwand gebundener Peroxidasen beobachtet, während eine rasche Aktivitäts-Einbuße der extrazellulären Peroxidasen (PODs) zu verzeichnen war. Eine Aktivität kovalent-gebundener PODs konnte nicht nachgewiesen werden. Zur Auftrennung der Peroxidase-Isoenzyme wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Eine detaillierte Beschreibung des Verhaltens einzelner POD-Isoenzyme gelang nach spezifischer *in situ*-Anfärbung der Gelbanden mit Peroxidase-Aktivität und Quantifizierung der Farbtintensität dieser Banden im Densitometer. Es wurden in den Extrakten zellulärer, ionisch-gebundener und extrazellulärer Enzyme vier anionische und zwei kationische POD-Isoenzyme mit **Isoelektrischen Punkten (pIs)** zwischen < 3.5 und > 10 nachgewiesen. Die Elicitor-Induktion zellulärer und Zellwand-gebundener PODs scheint demnach im wesentlichen auf der Aktivitätszunahme zweier Isoenzyme bei pI-Werten von 7.0 und > 10 zu beruhen, da die Aktivität der Isoenzyme bei pIs von 7.3 und 7.8 sich kaum von jener der unbehandelten Kontrollkulturen unterschied und nur eine geringe Aktivität zellwandgebundener kationischer PODs nachgewiesen wurde. Polle et al. (1994) zeigten, daß in Fichten während einer gesamten Vegetationsperiode stark alkalische apoplastidäre Peroxidasen ($pI > 9$) auftraten, daß jedoch kurz nach dem Neuaustrieb und der damit beginnenden Lignifizierung zwei neue Isoenzyme bei pI 7.1 und 8.1 auftraten. Möglicherweise handelt es sich bei dem ligninspezifischen Isoenzym mit pI 7.1 um das gleiche wie in den Fichten-Suspensionskulturen (pI 7.0). Im Medium der Suspensionskultur traten drei der anionischen PODs (pI 7.0, 7.3, 7.5) und zwei intensive Banden von kationischen PODs (pI < 3.5 , 4.3) auf. Nach Elicitor-Zugabe wurde eine Aktivitätsabnahme sämtlicher anionischer und kationischer PODs beobachtet. Die Aktivität eines kationischen Isoenzyms (pI < 3.5) ging allerdings nur auf ca. 45 % des Wertes in Kontrollkulturen zurück. Meßner und Boll (1994) zeigten mit der hier beschriebenen Zellkultur, daß der Aktivitätsverlust extrazellulärer Peroxidasen auf die Akkumulation hoher Konzentrationen von H_2O_2 im Kulturmedium („oxidative burst“) zurückzuführen ist. Dabei wurde gezeigt, daß die Aktivitäts-Abnahme sich nicht auf Peroxidasen beschränkt, sondern auch eine deutliche Abnahme der Aktivität von weiteren extrazellulären Enzymen wie β -Glucosidase, Saurer Phosphatase, α -Amylase und Pektinase zu verzeichnen war. Die Aktivität extrazellulärer PODs, wenn diese auf den Proteingehalt bezogen wird, war drei Tage nach Elicitierung ca. 25 % höher als die Summe der Aktivitäten von zellulären und ionisch-gebundenen PODs. Gaspar et al. (1985) vermuteten, daß in Pflanzen eine zweistufige Antwort auf exogene Stimuli auf der Ebene der Aktivität spezifischer POD-Isoenzyme existiert. Demnach würde eine Signalsubstanz im Rahmen der pflanzlichen Sireßantwort zunächst eine rasche Induktion der Aktivität kationischer PODs bewirken, die anschließend gemeinsam mit Ascorbat in den Interzellularraum sekretiert würden, um eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung aktivierter Sauerstoffspezies zu übernehmen. In einem zweiten Schritt würde durch die Aktivierung anionischer PODs der Einbau ligninartiger Polymere in die Zellwände katalysiert. Tatsächlich traten extrazellulär in den Fichten-Suspensionskulturen vor allem kationische und intrazellulär anionische POD-Isoenzyme auf. Da in der Literatur äußerst

widersprüchliche Aussagen über die Bedeutung der verschiedenen Isoenzyme zu finden sind, sollten deren Eigenschaften (Substratspezifität gegenüber Monolignolen, subzelluläre Lokalisation, Aminosäuresequenz, Korrelation von Enzymaktivität und Genexpression mit Lignifizierung) für jedes experimentelle System erneut überprüft werden (Davin und Lewis 1992) und somit ist Vorsicht bei der Interpretation der im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Daten geboten. Dies gilt vor allem, wenn die Ligninbildung von einem zweiten Effekt, nämlich der Inaktivierung extrazellulärer Enzyme durch die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, überlagert ist.

Da die Lokalisation der Lignin-Biosynthese in den verwendeten Fichten-Suspensionskulturen durch die Untersuchungen zur Induktion von Peroxidase-Isoenzymen noch nicht belegt werden konnte, wurde ein Experiment zur Hemmung von Enzymen, die für die Polymerisation der Monolignole zuständig sind, unternommen. Eine solche Hemmung würde möglicherweise zur Akkumulation von Vorläufersubstanzen der Lignin-Synthese führen, da die für die Polymerisation benötigten Enzyme ihre Aktivität einbüßten. Eine Hemmung von Peroxidasen und Laccasen führte allerdings, obwohl die Akkumulation von Ligninen in den Zellwänden und im Kulturmedium von Elicitor-behandelten Suspensionskulturen unterbunden wurde, weder zur Anreicherung von Monolignolen oder deren Glucosiden, noch zur Bildung von Dilignolen wie Lignanen. Die Konzentrationen sämtlicher mittels HPLC erfaßter Substanzen sank in den Zellen, den Zellwänden und im Medium nach Elicitor- und Inhibitor-Behandlung leicht ab. Ein Hinweis auf die Lokalisation der für die Produktion des extrazellulären ligninartigen Polymers notwendigen Enzyme konnte somit nicht erhalten werden. Möglicherweise hatten die verwendeten Inhibitoren eine hemmende Wirkung auf frühe Enzyme der Monolignol-Biosynthese, sodaß die Phenylpropane nicht entstanden.

Synthetische Bedingungen für die Monolignol-Polymerisation

Freudenberg und Mitarbeitern gelang die Synthese ligninartiger Polymere *in vitro* wenn Coniferylalkohol entweder mit H_2O_2 und käuflicher Merrettich-Peroxidase oder mit O_2 und einer Laccase aus dem Pilz *Polyporus versicolor* inkubiert wurden (Freudenberg 1965). Die dabei gebildeten Produkte, sogenannte Dehydrierungspolymerisate (DHPs), waren aus den gleichen strukturellen Grundbausteinen und Bindungstypen wie die Holzlignine der Koniferen aufgebaut. Eine genauere Analyse der einzelnen Bindungstypen im Polymer ergab allerdings, daß deutliche strukturelle Unterschiede zwischen DHPs und Holzligninen bestanden (Erdtman 1957). Der Einfluß der experimentellen Bedingungen, wie z.B. die Zutropfgeschwindigkeit der Substrate zur Enzymlösung und damit die lokale Konzentration dieser am Syntheseort, auf die Struktur des Endproduktes wurde von Sarkanen und Ludwig (1971) ausführlich diskutiert. Mit Hilfe der Thioacidolyse charakterisierten Tollier et al. (1991) die während einer raschen (Zulauf-Verfahren) und einer langsamen (Zutropf-Verfahren) Substrat-Zugabe gebildeten Lignine. Die typischen Eigenschaften dieser *in vitro*-Polymere waren, im Vergleich zu

Holzligninen, ein erhöhter Gehalt an Coniferylalkohol-Endgruppen, β -5- und β -8-Struktureinheiten und ein geringerer Prozentsatz an 5-5- und β -1-Struktureinheiten. Des weiteren wählten die Autoren das enzymatische System Glucose/Glucose-Oxidase zur *in situ*-Erzeugung von H_2O_2 in geringer aktueller Konzentration und erreichten damit eine gewisse Angleichung der Struktureigenschaften des gebildeten DHPs zu den Holzligninen (Reduktion des relativen Gehalts an β -8-, Erhöhung des Gehalts an β -1-Struktureinheiten). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die oben beschriebenen Ansätze zur Reduktion der aktuellen Substratkonzentrationen weiterverfolgt. Als zweites enzymatisches System wurde Coniferin/ β -Glucosidase zur *in situ*-Erzeugung von Coniferylalkohol verwendet und auch mit der bei Tollier et al. (1991) angegebenen Methode zur H_2O_2 -Erzeugung kombiniert. Generell konnte auf diese Weise der Anteil an 5-5- und β -1-Struktureinheiten leicht erhöht und jener von β -8-Einheiten leicht erniedrigt werden. Eine deutliche Annäherung an die Strukturmerkmale von ECL oder Holzlignin (SWL) konnte allerdings, wie auch von Tollier et al. (1991), nicht erreicht werden. Um den Bedingungen bei der Synthese der Holzlignine mit *in vitro*-Ansätzen näherzukommen, müßten noch effektivere Verfahren zur Gewährleistung einer langsamen Substratfreisetzung gefunden werden und sollte auch die POD-Enzymaktivität besser reguliert werden. Präparationen zellulärer und ionisch-gebundener Enzyme, sowie das Kulturmedium von Fichten-Suspensionskulturen wurden anstelle von Meerrettich-Peroxidase für die DHP-Synthese verwendet. Die Zugabe von Coniferylalkohol und H_2O_2 führte bei sämtlichen Extrakten zur Bildung von DHPs. Die Struktur dieser Produkte wies die strukturellen Eigenschaften von *in vitro*-Polymeren auf, die unter Reduktion der Substratkonzentration synthetisiert wurden (Tollier et al. 1991). Dies läßt vermuten, daß im Fall der mit Zellkultur-Enzymen erhaltenen DHPs eine geringere Peroxidase-Aktivität gegenüber dem Ansatz mit käuflicher Meerrettich-Peroxidase der Grund für die veränderten strukturellen Eigenschaften der DHPs war. Ein wichtiger Einfluß auf die Ligninstruktur, nämlich der Effekt einer vorgeformten Kohlenhydratmatrix, in die Lignine *in vivo* einpolymerisiert werden, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die wenigen bisher publizierten Ansätze, die Struktur von Ligninen, welche in Gegenwart von Polysacchariden *in vitro* gebildet wurden, zu untersuchen, zeigten die ungemeine Komplexität bei der Simulation der *in vivo*-Bedingungen auf. So verwendeten Higuchi et al. (1971) Hemicellulosen oder Pektine der Buche als Matrices für die DHP-Synthese, doch waren die von den Autoren eingesetzten Methoden der Struktur-aufklärung (photometrische Bestimmung der phenolischen Hydroxylgruppen und Nitrobenzol-Oxidation) wenig geeignet für eine detaillierte Charakterisierung der DHPs. Terashima und Seguchi (1988) wiesen nach, daß die Anwesenheit von Kohlenhydraten wie Pektin, Mannan oder Dextran einen Einfluß auf die Ligninstruktur ausübt, doch konnten sie mit der verwendeten Methode nur den relativen Anteil jener Struktureinheiten quantifizieren, die an der Position 5 des Phenylpropan-Aromaten eine C-C- oder C-O-Bindung eingegangen waren. Auch dürften die von den Autoren benutzten Kohlenhydrate, die entweder aus Pflanzen extrahiert waren (Pektin und Mannan) oder synthetisch erhalten wurden (Sephadex), wenig strukturelle Ähnlichkeit mit intakten Zellwänden während der Lignifizierung *in vivo*

haben. Wurde *p*-Cumarylalkohol als zweites Monolignol neben Coniferylalkohol in einem molaren Verhältnis wie in ECL (19 % von Coniferylalkohol) der Reaktionsmischung zur DHP-Synthese langsam zugegeben, spiegelte sich dieses Verhältnis bei der Verwendung von Meerettich-Peroxidase im gebildeten DHP wieder. Bei Einsatz von Präparationen zellulärer oder zellwandgebundener Enzyme und auch bei Verwendung des Kulturmediums von elicitor-induzierten Fichten-Suspensionskulturen wurde *p*-Cumarylalkohol bevorzugt eingebaut (25-40 %). Dabei war die Einbaurrate bei Verwendung des Mediums zur DHP-Synthese mit 40 % am größten. Auf der Ebene der Substratspezifität von PODs bestünde demnach eine weitere Regulationsstelle für den vermehrten Einbau von *p*-Cumarylalkohol in das extrazelluläre Streßlignin (ECL), wobei extrazelluläre PODs in dieser Hinsicht am effektivsten waren. Dies könnte ein Hinweis auf eine wesentliche Beteiligung der extrazellulären PODs an der Biosynthese von ECL sein.

2. Biosynthese phenolischer Polymere in ozonbehandelten Fichten-Keimlingen

Zur Überprüfung der Frage, ob die strukturellen Eigenschaften des extrazellulären Streß-Lignins aus Fichten-Suspensionskulturen eine allgemeinere Verbreitung in *de novo*-Ligninen finden, sollte die Ligninstruktur in ozonbehandelten Fichtenkeimlingen untersucht werden. Dieses experimentelle Modellsystem war am Institut gut etabliert. Galliano et al. (1993 a,b) konnten zeigen, daß die Aktivität der Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) und deren Transkriptmenge in Nadeln von Fichtenkeimlingen unter dem Einfluß von Ozon eine dosisabhängige Induktion erfuhr. Da die CAD-Aktivität für die Biosynthese der Lignine benötigt wird, lag die Vermutung nahe, daß auch die Akkumulation von Lignin durch eine Ozon-Exposition induziert würde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einbau phenolischer Polymere in die Zellwände der Nadeln und Hypokotylen von Fichten-Keimlingen als ein früher Effekt einer Ozonbehandlung, noch bevor sichtbare Schäden auftraten, gezeigt. Diese Untersuchungen wurden um die Messungen von CAD und POD in Nadeln und Hypokotylen erweitert.

2.1 Akkumulation von Lignin und Suberin

Lignin wurde histochemisch im Leitgewebe und in der Epidermis, Suberin ausschließlich in der Epidermis der Nadeln und Hypokotyle nachgewiesen. Nach Maßgabe der LTGA-Methode induzierte Ozon die Akkumulation von Suberin und Lignin, die mit dieser Methode als phenolische Polymere gemeinsam erfaßt werden, in den Zellwänden der Nadeln und Hypokotyle. Es ist nicht geklärt, ob dieser Einbau phenolischer Polymere in Hypokotylen ein systemisches Phänomen ist. Der mikroskopische Nachweis von Schließzellen in Zellwänden von Hypokotylen läßt jedoch vermuten, daß ein Gasaustausch von Hypokotylen und der

angrenzenden Atmosphäre möglich ist. Die Struktur des Ligninanteils der Nadeln und Hypokotyle wurde mit Hilfe der Thioacidolyse untersucht. Die Ligninstruktur wies nach Maßgabe der Thioacidolyse einige der typischen Eigenschaften von *de novo*-Ligninen wie den gegenüber dem Holzlignin erhöhten Anteil von *p*-Hydroxyphenyl (H)-Einheiten und eine vom Holzlignin verschiedene Zusammensetzung aus quervernetzenden Struktureinheiten (s. IV 1.1) auf. Durch die Ozonbehandlung wurde der relative Anteil von H-Einheiten in den Ligninen der Keimlinge nicht weiter erhöht. Mittels Thioacidolyse konnte die gesteigerte Akkumulation phenolischer Polymere nach Ozonbehandlung, wie sie mit Hilfe der LTGA-Methode nachgewiesen wurde, nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz kann möglicherweise mit der unterschiedlichen analytischen Zugänglichkeit der stark quervernetzten „kondensierten“ Struktur-Bausteine im Lignin und Suberin für die beiden Methoden erklärt werden. Werden für die Lignin-Charakterisierung Abbaumethoden verwendet, so tritt in allen Fällen die Limitierung auf, daß die analysierbaren Produkte nur in mäßig hohen Ausbeuten erhalten werden. Dies ist auf das Vorkommen chemisch stabiler Bindungen im Lignin, der kondensierten Bindungen zurückzuführen. Nach Thioacidolyse können nur monomere und dimere Reaktionsprodukte quantitativ erfaßt werden. Die ebenfalls gebildeten tri-, tetra- und oligomeren Produkte bleiben unberücksichtigt (Lapierre 1993). Auf der anderen Seite erlaubt die LTGA-Methode durch Messung der Absorption der Lignin-Thioglycolsäure-Derivate eine zufriedenstellende Quantifizierung von lignin- und suberinartigen Polymeren, wobei auch die höhermolekularen Anteile analysiert werden (Graham und Graham 1991). Der entscheidende Nachteil der LTGA-Methode besteht in der Tatsache, daß bisher noch keine detaillierten strukturellen Informationen gewonnen werden können. Im Wissen um die Möglichkeiten und Grenzen der verschiedenen Methoden der Lignin- und Suberin-Charakterisierung kann nur ein Flickenteppich struktureller Informationen, gewonnen aus unterschiedlichen analytischen Ansätzen, ein Verständnis der komplexen Struktur dieser unlöslichen und quervernetzten Strukturen erlauben.

2.2 Induktion von Enzymen der Lignin-Biosynthese

Der Zellwand-Einbau phenolischer Polymere als Reaktion auf eine Ozonbehandlung wurde in verschiedenen Koniferen von einer Induktion von Enzymen der Lignin-Biosynthese begleitet (Tab. 43). So berichteten Galliano et al. (1993 a,b) über den Anstieg der CAD-Aktivität und CAD-mRNA in Fichten-Keimlingen ab 200 nl l⁻¹ Ozon. Heller et al. (1990 b) fanden einen Anstieg der CAD-Aktivität in Nadeln von Fichten schon ab 80 nl l⁻¹ Ozon, wenn die Schadgasbehandlung über zwei Vegetationsperioden fortgesetzt wurde. Langebartels et al. (1990) wiesen eine 10-fach erhöhte CAD-Aktivität in Nadeln von vier Jahre alten Kiefern nach, die mit 150 nl l⁻¹ Ozon behandelt wurden. Auch die Induktion der Peroxidase-Aktivität wurde wiederholt für ozonexponierte Koniferen belegt. Nach Kurzzeitpulsen mit 150 nl l⁻¹ Ozon wurde eine POD-Induktion in Fichten-Sämlingen von Castillo et al. (1987) gefunden. Bei einer kombinierten Behandlung mit 80 nl l⁻¹ Ozon und 750 nl l⁻¹ CO₂

beobachteten Polle et al. (1993) ebenfalls einen Anstieg der POD-Aktivität. Für drei verschiedene Freilandstandorte mit unterschiedlichen ambienten Ozonkonzentrationen wurde von Ikemeyer et al. (1993) eine positive Korrelation zwischen der Aktivität apoplastidärer PODs und der durchschnittlichen Ozonkonzentration nachgewiesen.

Tab. 43. Zusammenstellung der Literatur über den Effekt von Ozon auf Enzyme der Lignin-Biosynthese.

Koniferenspezies	Schadgasbehandlung	Biochemische Reaktionen	Literatur
<i>Picea abies</i> (Alter 4 Jahre)	600 nl l ⁻¹ O ₃ (7 h/d)	Induktion der Aktivität Zellwand-gebundener und apoplastidärer Peroxidasen und Superoxid-Dismutasen, Abnahme von Ascorbat in Nadeln	[1]
<i>Picea abies</i> (Alter 3 Jahre)	Kombination von 200-700 nl l ⁻¹ O ₃ und saurem (pH 3.0) Nebel (Tagesgang über 14 Monate)	Induktion der Zimtalkohol-Dehydrogenase-Aktivität	[2]
<i>Pinus sylvestris</i> (Alter 4 Jahre)	150, 300 und 600 nl l ⁻¹ O ₃ (7 h/d, 39 d)	Anstieg der Aktivitäten von Phenylalanin-Ammoniak-Lyase und Zimtalkohol-Dehydrogenase in Nadeln	[3]
<i>Picea abies</i> (Alter 4 Wochen)	200 und 300 nl l ⁻¹ O ₃ (8 h/d, 15 d)	Anstieg der Aktivität von Zimtalkohol-Dehydrogenase in Nadeln	[4]
<i>Picea abies</i> (Alter 4 Wochen)	300 und 600 nl l ⁻¹ O ₃ (8 h/d, 25 d)	Anstieg der Zimtalkohol-Dehydrogenase-mRNA in Nadeln	[5]
<i>Picea abies</i> (Alter 3 Jahre)	Kombination von 80 nl l ⁻¹ O ₃ und 750 µl l ⁻¹ CO ₂ (24 h/d, 5,5 Monate)	Abfall der Aktivität von Superoxid-Dismutase und Catalase, Anstieg der Aktivität von Peroxidase in Nadeln	[6]
<i>Picea abies</i> (Alter > 50 Jahre)	Freilandstandorte mit unterschiedlich hohen ambienten O ₃ -Konzentrationen	positive Korrelation von Ozonkonzentration und der Aktivität apoplastidärer Peroxidasen in Nadeln	[7]

Literatur: [1] Castillo et al. (1987), [2] Heller et al. (1990 b), [3] Langebartels et al. (1990), [4] Galliano et al. (1993 a), [5] Galliano et al. (1993 b), [6] Polle et al. (1993), [7] Ikemeyer et al. (1993).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden schon drei Tage nach Beginn der Ozon-Behandlung in den Nadeln und Hypokotylen der Fichten-Keimlinge gegenüber den in Reinflut kultivierten Kontrollen deutlich höhere Aktivitäten von Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) und Peroxidase (POD) gemessen, deren Induktionsverhalten zeitlich mit der Akkumulation phenolischer Polymere in den Zellwänden korrelierte. Die Induktion der CAD-Aktivität wies dabei eine signifikante Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit auf. Die in den Hypokotylen ermittelte Aktivität war um den Faktor 1.8-2.5 höher als in den Nadeln und spiegelte damit in etwa den um 3.0-3.5-fach höheren Ligningehalt wieder. Die bisher publizierten und die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten lassen die Schlußfolgerung zu, daß die Enzymaktivitäten von CAD und POD als frühe biochemische Biomarker für eine Ozonbelastung gelten können.

Im Laufe einer Schadgas-Exposition setzen häufig rasch verschiedene Abwehrmechanismen von Pflanzen wie die Induktion des Sekundärstoffwechsels auf der Ebene von Transkription, Enzymaktivitäten und Metabolitakkumulation ein. Sichtbare Schäden erscheinen meist erst deutlich später und können auf den Einfluß eines zweiten Stressors (z.B. Pathogen-Infektion) zurückzuführen sein. Es gibt Hinweise für die Vermutung, daß die erhöhte Empfindlichkeit von schadgasexponierten Pflanzen gegenüber verbreiteten Krankheiten, vor allem pilzlichen Ursprungs, ein sehr wichtiger, wenn auch indirekter, Faktor bei der Ausprägung der neuartigen Waldschäden in Mitteleuropa ist (James et al. 1980; Madden und Campbell 1987; Manning und Keane; Bonello et al. 1993). Wie schon zuvor erwähnt, sollte die potentielle Rolle einer induzierten Lignifizierung und Suberisierung in allerdings eher im Aufbau struktureller Barrieren zum Schutz vor dem Eindringen von Mikroorganismen dienen. Möglicherweise besteht die verhängnisvolle Wirkung von Ozon bei Pflanzen in der Zerstörung einer geregelten Abwehr, da die phenolischen Sekundärstoffprodukte zur falschen Zeit am falschen Ort akkumulieren und somit für die Abwehr einer später auftretenden Pathogeninfektion nicht mehr zur Verfügung stehen. In der natürlichen Umgebung ist eine Pflanze einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Streßfaktoren ausgesetzt, die ihrerseits zur Induktion verschiedener Abwehrmechanismen führen können. Solche komplexen Wechselwirkungen sind an Freilandstandorten nur äußerst schwierig nachzuweisen, was die Bedeutung von experimentellen Modellsystemen wie Keimlingen, die unter definierten Bedingungen angezogen und mit Schadgasen exponiert werden, für die Erforschung dieser Zusammenhänge verdeutlicht.

3. Bindungstyp von 3,4-Dichloranilin (DCA) in Dehydrierungs-polymerisaten (DHPs) und Hydrolyseempfindlichkeit dieser Bindung

3.1 Der Bindungstyp von DCA in DHPs

Für 3,4-Dichloranilin (DCA), einem wichtigen Stoffwechselintermediat des Metabolismus' verschiedener Herbizide in Pflanzen, wurde wiederholt der Einbau in ligninartige Bestandteile der Zellwände beschrieben (Yih et al. 1968; Sutherland 1976; Still et al. 1983; Langebartels und Harms 1988; Pogany et al. 1990; Sandermann et al. 1992). Die Kenntnis des Bindungstyps von DCA in den sogenannten „nicht-extrahierbaren Rückständen" ist ein wichtiger Schritt bei der Bewertung der toxikologischen Relevanz dieser Fremdstoff-Rückstände in Nahrungspflanzen, da die Menge des im Magen-Darm-Trakt von Tier und Mensch resorbierten Fremdstoffs in direktem Zusammenhang zur Art der Bindung der entsprechenden Chemikalie steht. Für den Bindungstyp von DCA im Ligninanteil von nicht-extrahierbaren Rückständen in Reispflanzen schlugen Still et al. (1981) die Bindung von DCA an C- α der Phenylpropan-Seitenkette des Lignins vor. Die gleiche Art der Bindung wurde von v.d.Trenck et al. (1981) für DCA in einem synthetischen DCA-Coniferylalkohol-Copolymer

(Dehydrierungspolymerisat; DHP) postuliert. Sandermann et al. (1992) zeigten, daß bei milder saurer Hydrolyse (0.1 M HCl, 37°C), die als Simulation für die Bedingungen im Säugermagen eingesetzt wurde, aus einem solchen DHP innerhalb von wenigen Minuten ca. 30 % der inkorporierten Radioaktivität aus DCA in die saure Hydrolyselösung überging und die hydrolysierte Substanz bei der Dünnschichtchromatographie mit dem DCA-Standard comigrierte. Nach dieser anfänglichen schnellen Freisetzung von Radioaktivität, von den Autoren als „burst release“ bezeichnet, war die Zunahme der Radioaktivität in der Hydrolyselösung über dem Polymer nur noch gering und ähnelte der Kinetik bei der Hydrolyse von nicht-extrahierbaren Weizen-Rückständen, bei denen in den ersten zwei Stunden eine lineare Freisetzung von ca. 10 % des DCAs beobachtet wurde. Diese Diskrepanz in der Hydrolysebeständigkeit der Bindung von DCA in beiden Polymeren begründeten die Autoren mit dem Vorkommen zweier Bindungstypen für DCA im DHP. Zum einen bestünde eine Säure-labile Bindung von DCA zum C- α der aliphatischen Seitenkette von Phenylpropan-Einheiten des Lignins nur im DHP. Zweitens gäbe es eine stabile Bindung zum C-6 des Guajacylringes in beiden Ligninen, die langsamer hydrolysiert wird. Eine eindeutige Aussage zum Bindungstyp von DCA in DHPs und nicht-extrahierbaren Rückständen ist nur durch Vergleich mit den spektroskopischen und chemischen Eigenschaften geeigneter Modellsubstanzen möglich. In der Literatur sind eine Reihe von Arbeiten zum Mechanismus der Bindung von phenolischen Substanzen und Glucose an C- α der Seitenkette von Dilignol-Modellsubstanzen zu finden (Freudenberg 1968; Tanaka et al. 1979; Brunow et al. 1989; Sipilä und Brunow 1991), Untersuchungen zur Bindung von DCA an solche Modellsubstanzen sind jedoch bisher von keiner Arbeitsgruppe publiziert worden. In der vorliegenden Arbeit sollte diese experimentelle Lücke geschlossen werden. Dazu wurden zunächst verschiedene DHPs synthetisiert. Als Referenz eines DCA-freien Polymers wurde ein DHP in leichter Abwandlung nach Freudenberg (1968) aus Coniferylalkohol und H₂O₂ unter Katalyse von Merrettich-Peroxidase synthetisiert (Ref-DHP). Nach dem gleichen Procedere wurden Copolymerisate mit äquimolaren Mengen von Coniferylalkohol und DCA (DCA-DHP; auch mit [¹⁴C] DCA, als [¹⁴C] DCA-DHP bezeichnet) bzw. [¹⁵N] Anilin (Ani-DHP) hergestellt. Die Einbauraten von DCA und [¹⁵N] Anilin in die DHPs lagen zwischen 40 und 50 %. Daraus resultiert ein molares Verhältnis im Polymer von Coniferylalkohol/DCA von 2-2.5:1. Die Polymere wurden mittels ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die in Ref-DHP auftretenden Signale konnten recht gut mit den bisher publizierten NMR-Daten zugeordnet werden (Lapierre et al. 1987; Robert 1993). Diese Zuordnungstabellen entstanden nach ausführlichen ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten auch mit Modellsubstanzen für die unterschiedlichen Bindungstypen in Holzligninen. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten NMR-Spektren wurden unter vergleichbaren Bedingungen wie die oben angegebenen Literatur-Daten erhoben. Der Vergleich der ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von Ref-DHP mit DCA-DHP zeigte, daß in DCA-DHP mehr Signale im chemischen Verschiebungsbereich der aliphatischen Phenyl-propan-Seitenkette und im Aromatenbereich auftraten. Die neuen Signale aliphatischer H- und C-

Atome in DCA-DHP wurden mit Ani-DHP exakt reproduziert. Im Aromatenbereich traten, wie schon allein aufgrund der unterschiedlichen Struktur von Anilin und DCA zu erwarten war, einige Unterschiede auf. Im ^1H -entkoppelten ^{15}N -NMR-Spektrum von Ani-Mod 1 waren zwei Signalgruppen in direkter Nachbarschaft mit einem Intensitätsverhältnis von 85:15 zu erkennen. Eine weitere Zuordnung der in DCA-DHP und Ani-DHP gegenüber Ref-DHP zusätzlich auftretenden Signale konnte allerdings erst nach Vergleich mit den Modellsubstanzen getroffen werden.

Für die Auswahl der Modellverbindungen für eine säurelabile Bindung von DCA in DHPs wurden die folgenden Überlegungen angestellt: Eine Möglichkeit der Anlagerung von DCA wäre die von Still et al. (1981) und Sandermann et al. (1992) vorgeschlagene Bindung an C- α der aliphatischen Seitenkette. Bindungen an das α -C-Atom der Seitenkette wurden in der Literatur als die reaktivsten Bindungen in Ligninen beschrieben (Freudenberg 1968; Monties 1989). In Versuchen mit Addukten von Glucose an C- α von Lignin-Modellsubstanzen zeigten Sipilä und Brunow (1991), daß in 0.1 M HCl bei 23°C innerhalb von zwei Wochen ca. 30 % der Glucose freigesetzt wurden. Möglicherweise wäre eine Benzylamin-Bindung unter gleichen Bedingungen labiler, doch war es fraglich, ob die Reaktivität einer Bindung von DCA an C- α ausreichen würde für eine so rasche Hydrolyse, wie von Sandermann et al. (1992) für die Freisetzung von DCA aus dem DHP beschrieben. Zur Überprüfung der chemischen Eigenschaften einer Benzylamin-Bindung von DCA in DHPs wurden entsprechende Modellsubstanzen in einer Zweischritt-Reaktion synthetisiert. Edukt der Reaktion war das Dilignol-Modell Guajacylglycerol- β -guajacylether, ein Struktur analogon des am häufigsten in Ligninen vorkommenden Bindungstyps, der β -O-4-Bindung. Zunächst wurde durch Substitution der α -Hydroxylgruppe durch Brom und anschließende Elimination des Broms ein Chinonmethid der Ausgangssubstanz erzeugt, an welches in einem zweiten Schritt DCA addiert wurde. Die Bindung von DCA erfolgte ausschließlich in der α -Position der Seitenkette. Als Produkt wurde ein Stereoisomeren-Gemisch von 80:20 (*threo*/*erythro*) erhalten. Die Reaktionsprodukte wurden mit DCA-Mod 1 (*threo*-Isomer) und DCA-Mod 2 (*erythro*-Isomer) bezeichnet. Mit derselben Reaktionssequenz wurden zwei weitere Stereoisomere durch Addition von [^{15}N] Anilin an das Chinonmethid von Guajacylglycerol- β -guajacylether gewonnen. Sie wurden mit Ani-Mod 1 (*threo*-Isomer) und Ani-Mod 2 (*erythro*-Isomer) bezeichnet. Als eine zweite potentielle hydrolytisch labile Bindungsstelle für DCA in DHPs wurde die Addition an C- γ in Coniferylaldehyd-Endgruppen untersucht. Die Anlagerung von DCA würde in diesem Fall zur Ausbildung eines Azomethins führen. Eine Modellsubstanz für diesen Bindungstyp wurde durch Addition von DCA an Coniferylaldehyd erhalten (DCA-Mod 3). Sämtliche Modellsubstanzen wurden mit verschiedenen ein- und zweidimensionalen ^1H - und ^{13}C -NMR-Methoden charakterisiert. Mit den [^{15}N] Anilin enthaltenden Modellsubstanzen wurden zusätzlich ^{15}N -NMR-Experimente durchgeführt.

Eine Bindung von DCA an C- γ von Coniferylaldehyd-Endgruppen in DHPs konnte nach Vergleich der NMR-Spektren der DHPs mit jenen von DCA-Mod 3 ausgeschlossen werden. Im Bereich der chemischen Verschiebung von Azomethin-H- und C-Atomen wurden in DCA-DHP keine Signale detektiert. Der Anteil von Coniferylaldehyd-Endgruppen an den strukturellen Bindungstypen in DHPs beträgt nach Maßgabe der Thioacidolyse weniger als 4 % (Tollier et al. 1991; s. auch diese Arbeit) und kann somit nicht für die Bindung eines größeren Anteils von DCA verantwortlich sein. Ein weiteres Indiz, das gegen eine Beteiligung von Coniferylaldehyd-Endgruppen an der Bindung von DCA spricht, sind die Synthesbedingungen, die für eine Azomethin-Synthese erforderlich sind. Bei der Synthese muß für das Entfernen des dabei gebildeten Wassers gesorgt sein, da das Gleichgewicht der Reaktion ansonsten wieder auf die Seite der Edukte verschoben wird. Die DHP-Synthese findet allerdings in Phosphatpuffer statt und es erscheint unwahrscheinlich, daß eine Bindung von DCA an Coniferylaldehyd-Endgruppen unter diesen Bedingungen entstehen kann. DCA-Mod 3 hydrolysiert schon unter leicht sauren Bedingungen (pH 5.5) in Sekunden vollständig.

Einige der schon erwähnten Veränderungen in den NMR-Spektren von DCA-DHP und Ani-DHP gegenüber Ref-DHP konnten durch Vergleich mit den Modellsubstanzen für die Bindung von DCA und [^{15}N] Anilin an C- α der aliphatischen Seitenkette eindeutig diesem Bindungstyp zugeordnet werden. Die Veränderung der chemischen Umgebung an C- α wegen der Substitution der Hydroxylgruppe durch die aromatischen Amine wirkte sich deutlich auf die Signallage in den NMR-Spektren aus. So wurden das ^1H -Signal von H- α und das ^{13}C -Signal von C- α Hochfeld-verschoben und stimmten exakt mit den chemischen Verschiebungen der gegenüber Ref.-DHP neu auftretenden Signale in DCA-DHP und Ani-DHP überein. Die von v.d.Trenck et al. (1981) publizierten NMR-Spektren wiesen die gleichen chemischen Verschiebungen auf. Die Autoren verwendeten für die Zuordnung der Signale ebenfalls Modellsubstanzen, doch entsprechen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen besser den in Ligninen vorkommenden Bindungstypen. Durch Vergleich der ^1H , ^1H - und ^1H , ^{13}C -COSY-NMR-Spektren der DHPs mit jenen der Modellsubstanzen konnten auch im Aromatenbereich die auf die Bindung von DCA an C- α zurückzuführenden Signale zugeordnet werden. In diesen Zuordnungen ist ein wesentlicher Fortschritt zu den von v.d.Trenck et al. (1981) publizierten Daten zu sehen, da diesen Autoren keine geeigneten Addukte von DCA an Modellsubstanzen zur Verfügung standen und einige der moderneren Methoden der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie noch nicht ausgereift waren. Der eleganteste Beweis für das Vorkommen des beschriebenen Bindungstyps von DCA in DHPs wurde mit den ^{15}N -NMR-Spektren erbracht. Die bei Ani-DHP auftretenden zwei Signalgruppen zeigten die exakt gleichen chemischen Verschiebungen wie Ani-Mod 1 und Ani-Mod 2. Damit konnte zusätzlich das Stereoisomeren-Verhältnis in Ani-DHP bestimmt werden (85-90 % *threo*, 10-15 % *erythro*). Wegen des Fehlens weiterer Signale im ^{15}N -NMR-Spektrum von Ani-DHP konnte ausgeschlossen werden, daß noch ein weiterer Bindungstyp von [^{15}N] Anilin besteht. Da die Bindung von Anilin in sämtlichen Modellsubstanz-

Synthesen und in den Polymeren mit jener von DCA vergleichbar war, darf davon ausgegangen werden, daß auch für DCA nur ein Bindungstyp in DHPs in Frage kommt. Dies gilt auch für die von Simmons et al. (1989) in Copolymerisaten von Guajacol und 4-Chloranilin bzw. von Tatsumi et al. (1994) in Additions-produkten von DCA an Protocatechusäure gefundene Bindung von DCA an C-6 des Aromaten, die in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DHPs nicht vorkam. Ein solcher Bindungstyp entsteht offensichtlich nur dann, wenn keine aliphatische Seitenkette vorhanden ist und damit die Bildung eines Chinonmethids, welches die Bindung von DCA an C- α der Seitenkette begünstigen würde, nicht möglich ist. Für die Routine-NMR-Analytik des Bindungstyps von Anilinen, und dies gilt vermutlich auch für die Bindung weiterer Xenobiotika mit nukleophilen reaktiven Gruppen, in DHPs reicht nach den umfangreichen in dieser Arbeit vorgestellten NMR-spektroskopischen Daten der Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren dieser Polymere mit einem Referenz-DHP (DHP aus Coniferylalkohol) im Verschiebungsbereich der aliphatischen Seitenkette (Tab. 44) aus. Wenn ein ^{15}N -markiertes Amin verfügbar ist, würde die Empfindlichkeit der ^{15}N -NMR-Spektroskopie möglicherweise sogar für die Charakterisierung gebundener Rückstände von Amin-Xenobiotika in Pflanzen ausreichen. In diesem Fall wird die Analyse dadurch erleichtert, daß in den Zellwänden unbehandelten Pflanzen keine Signale im ^{15}N -NMR-Spektrum auftreten, da die natürliche Häufigkeit und die Empfangbarkeit dieses Kerns zu gering sind, um in realistischer Meßzeit (1-3 Tage) Signale von Proteinen als Stickstoff-haltige Komponenten der Zellwände zuzulassen.

Tab. 44. Zuordnung der für die Benzylamin-Bindung in Copolymerisaten von Coniferylalkohol und aromatischen Aminen (DCA-DHP, Ani-DHP) charakteristischen ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Signale der aliphatischen Seitenkette. Die chemischen Verschiebungen der gegenüber Ref-DHP neu auftretenden Signale sind unterstrichen.

Zuordnung	δ [ppm] in Ref-DHP	δ [ppm] in DCA-DHP	δ [ppm] in Ani-DHP
H- α in B-O-4-Struktureinheiten	4.70	4.73; <u>4.63</u>	4.73; <u>4.63</u>
H- β in B-O-4-Struktureinheiten	4.10	4.10; 3.32	4.32
C- α in B-O-4-Struktureinheiten	71.2	71.3; <u>56.7</u>	71.0; <u>56.7</u>
C- β in B-O-4-Struktureinheiten	84.9	84.9; <u>84.1</u>	84.9; <u>84.3</u>
^{15}N Anilin an C- α	-	-	-317.28 (threo) -313.73 (erythro)

3.2 Hydrolysestabilität der Bindung von Anilinen in DHPs

Neben den strukturellen Eigenschaften sollte die chemische Stabilität der Bindung von DCA in DHPs und Modells-substanzen untersucht werden. Die Hydrolysekinetik (0.1 M HCl, 37°C) eines Copolymers von ^{14}C DCA und Coniferylalkohol (^{14}C DCA-DHP) zeigte eine ähnliche Charakteristik wie von Sandermann et al. (1992) beschrieben. Innerhalb weniger

Minuten wurden ca. 25 % der Radioaktivität in der Hydrolyselösung gefunden. Durch Kopplung der HPLC mit einem Radiodetektor konnte gezeigt werden, daß tatsächlich [^{14}C] DCA als einzige radioaktiv markierte niedermolekulare Komponente freigesetzt wurde. In den nachfolgenden zwei Stunden gingen weitere 2-3 % der Radioaktivität in die wäßrige Phase über. Die Analyse der pH-Stabilität von [^{14}C] DCA-DHP zeigte, daß bei einem vergleichsweise milden pH-Wert von 3 und auch im alkalischen Bereich eine Erhöhung der Radioaktivität in der entsprechenden Pufferlösung auftrat. Bei pH 12 wurden nach 10 min mehr als 60 % der Radioaktivität im Puffer wiedergefunden. Die Quantifizierung der Anilin-Freisetzung wurde zusätzlich mittels ^1H -NMR-Spektroskopie überprüft. Dazu wurde Anil-DHP einer Hydrolyse in $\text{D}_2\text{O}/d_6\text{-DMSO}$ 2:1 (v/v) bei pH 1 (pH-Einstellung mit DCl) und 37°C unterzogen und das Auftreten der Signale von freigesetztem protoniertem [^{15}N] Anilin verfolgt. Diese Signale traten im Verschiebungsbereich zwischen 7.34 und 7.45 ppm auf und lagen damit außerhalb des Bereichs der aromatischen H-Atome des Polymers, womit eine Quantifizierung möglich war. Auf diese Weise wurde eine recht rasche Freisetzung von ca. 14-18 % (des [^{15}N] Anilins in den ersten 10 min der Hydrolyse, gefolgt von einer langsameren Freisetzung (20 % nach 3 h, 44 % nach 3 d) ermittelt. Ein Hydrolyseexperiment mit dem Stereoisomergemisch DCA-Mod 1/2 führte dagegen nach Maßgabe einer HPLC-Analyse zu einer langsamen Hydrolyse der Bindung von DCA an C- α von Guajacylglycerol- β -guajacylether. Nach 24-stündiger Inkubation wurde eine Hydrolyserate von ca 9 % ermittelt. Nur im stark sauren Bereich (pH < 2) wurde nach 10-minütiger Inkubation eine geringe Freisetzung von DCA beobachtet (ca. 3%). Diese Diskrepanz in der Hydrolyse-Stabilität von Modellsubstanz und Polymer war Anlaß für weitere Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre der Übergang von Anteilen des Polymers in die wäßrige Hydrolyselösung, ohne daß die Bindung von DCA gespalten wird. Diese Vermutung wurde mittels Gelpermeationschromatographie (HPSEC) überprüft. Die Hydrolysemischung wurde 5 min nach Beginn der Hydrolyse (0.1 M HCl, 37°C) zentrifugiert und der Überstand einer HPSEC-Analyse unterzogen. Tatsächlich enthielt der Überstand nach Maßgabe der Radioaktivitätsdetektion einen Anteil polymerer Komponenten von 50-60 %. Damit wurde gezeigt, daß die Kinetik der Akkumulation von Radioaktivität aus [^{14}C] DCA-DHP in der Hydrolyselösung aus der Überlagerung zweier Effekte resultiert, nämlich der Freisetzung von [^{14}C] DCA und der Löslichkeit des Polymers in 0.1 M HCl. Unter Berücksichtigung des in den ersten 10 min der Hydrolyse freigesetzten Radioaktivitätsanteils von ca. 25 % (Quantifizierung im Szintillationszähler) aus [^{14}C] DCA-DHP läßt sich abschätzen, daß 50-60 % davon auf einer [^{14}C] DCA-Freisetzung und 40-50 % auf der Löslichkeit des Polymers in der Hydrolyselösung beruhen. Wegen der Homogenität der Bindung von Anilinen in DHPs (ausschließlich Bindung an C- α der Seitenkette) sollte die Hydrolyse der Benzylamin-Bindung eine Reaktion erster Ordnung darstellen. Die Kinetik der Hydrolyse von [^{14}C] DCA aus [^{14}C] DCA-DHP wies allerdings zwei Phasen auf, nämlich eine rasch erfolgende Akkumulation von Radioaktivität in der wäßrigen Hydrolyselösung in den ersten 10 min, gefolgt von einer langsameren Radioaktivitäts-Freisetzung. Wie durch Hydrolyse der

Modellverbindung für die Benzylamin-Bindung (DCA-Mod 1/2) gezeigt wurde, ist eine sehr langsame Spaltung dieser Bindung zu erwarten.

Diese Diskrepanz in der Labilität der Bindung von Anilinen in DHPs und in den entsprechenden Modellverbindungen ist möglicherweise mit dem Vorliegen eines **Nachbargruppeneffektes** zu erklären. Dieser besteht darin, daß ein dem Reaktionszentrum benachbartes Atom (oder eine Atomgruppe; hier: β -O-4-gebundener Sauerstoff an C- β) mit nichtbindenden oder π -Elektronenpaaren die S_N -Reaktion (hier: Ersetzen von DCA durch Hydroxylgruppe) erleichtert, indem dieses Atom (bzw. die funktionelle Gruppe) als Nukleophil zuerst selbst das Reaktionszentrum angreift (intramolekulare S_N -Reaktion) und im zweiten Reaktionsschritt durch ein von außen kommendes Nukleophil verdrängt wird (Christen und Vögtle 1988). Das Vorliegen eines Nachbargruppeneffektes kann dadurch erkannt werden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Substitution (Amin wird gegen OH ausgetauscht) größer ist, als es ohne diesen Effekt der Fall wäre. Man spricht dann von „anchimerer Beschleunigung“. Der Nachbargruppeneffekt wird in der großtechnischen Zellstoffgewinnung genutzt (Gierer und Ljunggren 1979). Eine wesentliche Herausforderung für die Zellstoffproduktion ist die Entfernung der Lignine aus den verwendeten Hölzern. Im allgemeinen wird dabei die Spaltung der β -O-4-Bindungen in Ligninen durch Erhitzen in alkalischen Laugen erreicht. Zunächst wird die benzyliche Hydroxylgruppe in ein Phenolat-Anion überführt, welches ein intermediäres Epoxid zum C- β ausbildet. Gleichzeitig wird ein Phenoxid-Anion (Substituent an C- β) abgespalten. In einem zweiten Schritt wird unter Einfluß der Base der Epoxidring geöffnet, wobei an C- β eine weitere Hydroxylgruppe entsteht (Hubbard et al. 1992). Auch die Effektivität der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode zur Depolymerisierung von Ligninen, der Thioacidolyse, beruht auf einem Nachbargruppeneffekt (Lapierre et al. 1985; Reaktionsmechanismus unter II 10.1.4 abgebildet).

Der Nachbargruppeneffekt kann nur dann wirksam werden, wenn austretende Gruppe und die entsprechende Nachbargruppe in anti-periplanarer Position zueinander stehen. Der Prozeß der Hydrolyse der Benzylamin-Bindung in DCA-DHP unter dem Einfluß einer Nachbargruppe ist in Abb. 92 hypothetisch gezeigt.

Nach Protonierung des Amin-Stickstoffs wird DCA unter Ausbildung eines Epoxids abgespalten. Dabei greift der Sauerstoff des in β -Position gebundenen Phenylpropanrestes als Nukleophil das Reaktionszentrum an C- α an und unterstützt somit den Austritt von DCA. Möglicherweise sind die Konformationen der Substituenten an der aliphatischen Seitenkette in DHPs wegen der starken Quervernetzung dieser *in vitro*-Polymere (Tollier et al. 1991; s. auch IV 1.1 diese Arbeit) fixiert, so daß keine freie Rotation der Bindungen (wie in den Modellsubstanzen) mehr existiert. Ein Hinweis auf das Vorliegen mehrerer stabiler Konformationen wurde durch die ^{15}N -NMR-Spektroskopie erhalten. Die zwei mit Ani-DHP

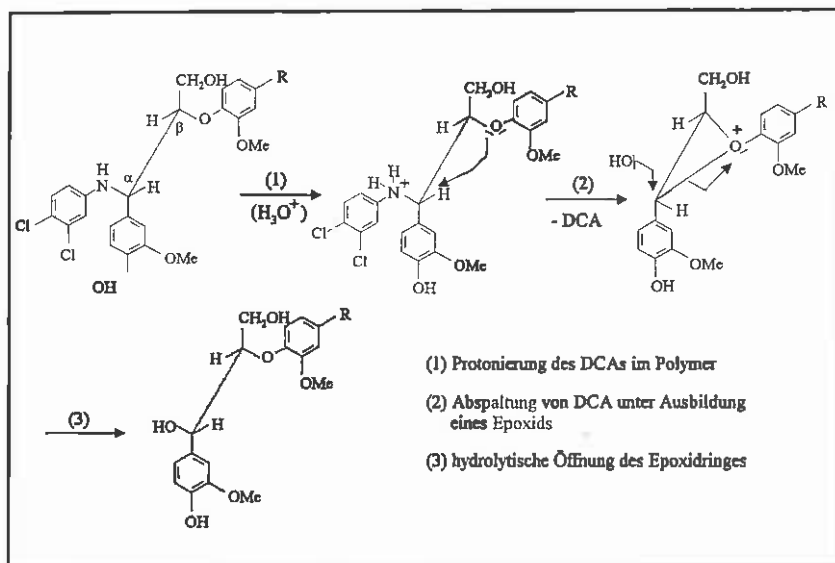


Abb. 92. Nachbargruppen-Effekt bei der Hydrolyse der Bindung von DCA an C- α der Seitenkette von Phenylpropan-Einheiten in DHPs.

erhaltenen Signalgruppen zeigten eine Feinstruktur, die den verschiedenen Konformationen der Substituenten an der Seitenkette zuzuordnen sein könnte. Eine eindeutige Bestätigung dieser Hypothese ist schwer zu erbringen. Es ist zu erwarten, daß eine Fixierung der Konformationen an der aliphatischen Seitenkette in DCA-DHP und Ani-DHP durch höhere Temperaturen aufzuheben sind, damit der Nachbargruppeneffekt nicht mehr wirksam wird, also eine langsamere Hydrolyse der Benzylamin-Bindung zu fordern ist. Möglicherweise wären auch Polymerisationsreaktionen mit niedrigeren Anteilen von DCA und [^{15}N] Anilin im Verhältnis zum eingesetzten Coniferylalkohol geeignet, die räumliche Umgebung der Bindung der Aniline im Polymer den Verhältnissen in nicht-extrahierbaren Rückständen von intakten Pflanzen besser wiederzuspiegeln.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Elicitor-induzierte Lignifizierung in Fichten-Suspensionskulturen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur eines ligninartigen Polymers (ECL) charakterisiert, welches im Medium von Fichten-Suspensionskulturen nach Inkubation mit einem *Rhizosphaera kalkhoffii*-Elicitor akkumulierte. Damit gelang erstmals eine detaillierte Beschreibung der Struktur eines „Streß-Lignins“. Mittels Thioacidolyse wurden in ECL größere Mengen an *p*-Hydroxyphenyl (H)-Einheiten, die aus der Verwendung von *p*-Cumarylalkohol als Monolignol stammen, nachgewiesen. Dieser strukturelle Baustein kommt im Koniferenholz nur in Ligninen der Zellwand-Mittellamelle, im Kompressionsholz und in sämtlichen bisher charakterisierten Zellkultur-Ligninen in nennenswerter Menge vor und zeigt die Ähnlichkeit von ECL zu den Ligninen der frühen Entwicklungsstufen der Lignifizierung in Koniferen auf. Des weiteren wies ECL gegenüber Holzligninen einen höheren Anteil an Pinoresinol (8-8)-Einheiten und einen geringeren Anteil an Diarylpropan (8-1)-Struktureinheiten auf. Die recht niedrige Ausbeute monomerer Thioacidolyse-Produkte und der relativ höhere Anteil von Thioacidolyse-Dimeren lassen annehmen, daß ECL ein stark verzweigtes Polymer mit einem hohen Prozentsatz von C-C-verknüpften Einzelbausteinen ist. In Hinsicht auf quervernetzende Strukturbausteine nimmt ECL eine Mittelposition zwischen den Holzligninen von Gymnospermen und synthetischen Ligninen (Dehydrierungspolymerisate; DHPs) ein. Eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung von ECL ergab, daß das Polymer hohe Anteile an Prolin und Hydroxyprolin enthält. Diese Strukturmerkmale deuten auf eine Ähnlichkeit des Proteinanteils von ECL mit Extensinen hin.

Als Folge der Elicitor-Behandlung wurde eine Induktion der Aktivität zellulärer und ionisch an die Zellwand gebundener Peroxidasen (PODs) beobachtet, während eine rasche Aktivitäts-Einbuße der extrazellulären PODs zu verzeichnen war. In den Extrakten zellulärer, ionisch-gebundener und extrazellulärer Enzyme wurden vier anionische und zwei kationische POD-Isoenzyme nachgewiesen. Die Elicitor-Induktion zellulärer und Zellwand-gebundener PODs beruhte im wesentlichen auf der Aktivitätszunahme zweier Isoenzyme mit Isoelektrischen Punkten (pI) von 7.1 und >9. Im Medium dominierten zwei kationische Isoenzyme (pI < 3.5, 4.5), deren Aktivitätsabnahme nach Elicitor-Zugabe auf die Akkumulation hoher Konzentrationen von H₂O₂ im Kulturmedium zurückzuführen war.

Durch Variation der Bedingungen während der Synthese von DHPs wurden die Strukturmerkmale dieser Polymere jenen von ECL angeglichen. Dabei wurden verschiedene Ansätze zur Reduktion der aktuellen Substratkonzentrationen durch enzymatische *in situ*-Erzeugung der Substrate verwendet. Mit Enzympräparationen aus Fichten-Suspensionskulturen wurde bei der DHP-Synthese eine erhöhte Einbaurate von *p*-Cumarylalkohol gegenüber Coniferylalkohol erhalten.

2. Biosynthese phenolischer Polymere in ozonbehandelten Fichten-Keimlingen

Nach Exposition von Fichten-Keimlingen mit erhöhten Ozonkonzentrationen (300 bzw. 600 nl l⁻¹ Ozon) wurde histochemisch und nach Maßgabe der Lignin-Thioglycolsäure-Methode ein vermehrter Einbau von ligninartigen Polymeren in die Zellwände nachgewiesen. Diese nach Ozonbehandlung beobachtete Akkumulation phenolischer Polymere wurde von einer Induktion der Enzymaktivitäten von Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) und POD begleitet. Die Induktion der CAD-Aktivität wies eine signifikante Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit auf.

3. Bindungstyp von 3,4-Dichloranilin in Dehydrierungspolymerisaten und Hydrolyseempfindlichkeit dieser Bindung

In der vorliegenden Arbeit gelang erstmals der zweifelsfreie Beweis, daß 3,4-Dichloranilin (DCA) in DHPs ausschließlich an C- α der aliphatischen Seitenkette von Phenylpropan-Einheiten gebunden ist. Um diese Zuordnung zu ermöglichen, wurden DHPs aus Coniferylalkohol und H₂O₂ unter Katalyse von Meerrettich-Peroxidase (Ref-DHP) und Copolymerisate mit äquimolaren Mengen Coniferylalkohol und DCA (DCA-DHP) bzw. [¹⁵N] Anilin (Ani-DHP) hergestellt. Die Polymere wurden mittels ein- und zweidimensionaler ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-NMR-Spektroskopie charakterisiert und die Signale in Ref-DHP durch Vergleich mit Literaturdaten zugeordnet. Zusätzlich wurden Modellsubstanzen für den potentiellen Bindungstyp von DCA in DHPs synthetisiert und ebenfalls NMR-spektroskopisch charakterisiert. Der Vergleich der NMR-Spektren von Modellsubstanzen und DHPs erlaubte die eindeutige Zuordnung des Bindungstyps als eine Benzylamin-Bindung. Da im ¹⁵N-NMR-Spektrum von Ani-DHP sämtliche auftretenden Signale diesem Bindungstyp zugeordnet werden konnten, kann damit ausgeschlossen werden, daß noch ein weiterer Bindungstyp besteht.

Während der Inkubation eines Copolymers aus [¹⁴C] DCA und Coniferylalkohol ([¹⁴C] DCA-DHP) mit 0.1 M HCl bei 37°C (Simulation des Milieus im Säugermagen) wurden innerhalb weniger Minuten ca. 25 % der Radioaktivität in die Hydrolyselösung freigesetzt. Eine Hydrolyse von Ani-DHP im NMR-Spektrometer unter obigen Bedingungen ergab eine Freisetzung von ca. 14-18 % von protoniertem [¹⁵N] Anilin in den ersten 10 min. Die Modellsubstanz für den Bindungstyp von DCA in DHPs hydrolysierte allerdings unter gleichen Bedingungen nur äußerst langsam (9 % Hydrolyse nach 24 h). Mittels Gelpermeationschromatographie konnte gezeigt werden, daß ein wesentlicher Anteil (40-50 %) des Polymers in der Hydrolysemischung löslich war. Die Akkumulation von Radioaktivität aus [¹⁴C] DCA-DHP in der Hydrolyselösung resultierte demnach aus der Überlagerung zweier Effekte, nämlich der Freisetzung von [¹⁴C] DCA und der Löslichkeit des Polymers in 0.1 M HCl. Die anfängliche rasche Freisetzung von DCA aus DHPs unter hydrolytischen Bedingungen ist möglicherweise auf das Vorliegen eines Nachbargruppen-Effektes zurückzuführen.

- Adler E (1977) Lignin chemistry - past, present, and future. *Wood Sci Technol* 11 169-217.
- Aist JR (1983) Structural responses as resistance mechanisms. In *The Dynamics of Host Defense* (Bailey JA, Deverall BJ, Hrsg.), Academic Press, Sidney, pp. 33-70.
- Akhtar MH (1987) The disposition of bound ^{14}C -agrochemical residues in plants and animal tissues when consumed by animals. In *Pesticide Science and Technology* (Greenalgh R, Roberts TR, Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 509-512.
- Albersheim P (1975) The walls of growing plant cells. *Sci Am* 232 80-95.
- Arcos JC, Arcos M (1962) Molecular geometry and mechanisms of action of chemical carcinogens. In *Fortschritte der Arzneimittelforschung* (Jucker E, Hrsg.), Berghauser Verlag, Stuttgart, pp. 405-581.
- Asada Y, Matsumoto I (1972) The nature of lignin obtained from downy mildew-infected japanese radish root. *Phytopathol Z* 73 208-214.
- Ayers RA, Ebel J, Valent B, Albersheim P (1976) Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol* 57 760-765.
- Bacic A, Harris PJ, and Stone BA (1988) Structure and function of plant cell walls. In *The Biochemistry of Plants* (Preiss J, Hrsg.), Bd. 14, Carbohydrates, Academic Press, New York, pp. 297-358.
- Bao W, O'Malley DM, Sederoff RR (1992) Wood contains a cell-wall structural protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 6604-6608.
- Bartha R, Linke HAB, Pramer D (1968) Pesticide transformations: production of chloroazobenzenes from chloroanilines. *Science* 161 582-583.
- Berger S, Braun S, Kalinowski H-O (1992) NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Blum H, Beier H, and Gross H (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8 93-99.
- Blumenkrantz N und Asboe-Hansen G (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54 484-489.
- Bockers M, Rivero C, Thiede B, Janowski T, Schmidt B (1994) Uptake, translocation, and metabolism of 3,4-dichloroaniline in soybean and wheat plants. *Z Naturforsch* 49c 719-726.
- Bolwell GP (1988) Synthesis of cell wall components: aspects of control. *Phytochemistry* 27 1235-1253.
- Boller T, Wiemken A (1986) Dynamics of vacuolar compartmentation. *Annu Rev Plant Physiol* 37 137-164.
- Bonello P, Heller W, Sandermann H (1993) Ozone effects on root-disease susceptibility and defence responses in mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *New Phytol* 124 653-663.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* 70 21-30.
- Bruce RJ, West CA (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol* 91 889-897.
- Brunow G, Sipilä J, Mäkelä T (1989) On the mechanism of formation of non-cyclic benzyl ethers during lignin biosynthesis. Part 1. The reactivity of 8-O-4 quinone methides with phenols and alcohols. *Holzforschung* 43 55-59.
- Brunow G, Kilpeläinen I, Lapierre C, Lundquist K, Simola, LK, Lemmetyinen J (1993) The chemical structure of extracellular lignin released by cultures of *Picea abies*. *Phytochemistry* 32 845-850.
- Butin H, Wagner C (1985) Mykologische Untersuchungen zur Nadelröte der Fichte. *Forstw Cbl* 104 178-186.
- Campbell MM, Ellis BE (1992) Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: cell wall-bound phenolics. *Phytochemistry* 31 737-742.
- Cassab G, Varner JE (1988) Cell Wall Proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39 321-353.
- Castillo FJ, Miller PR, Greppin H (1987) „Waldsterben“. Part IV. Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. *Experientia* 43 111-220.
- Christen HR, Vögtle F (1988) Organische Chemie - Von den Grundlagen zur Forschung, Bd. 1, Salle und Sauerländer Verlag, Aarau, Frankfurt.
- Cooper JB, Varner JE (1984) Cross-linking of soluble extensin in isolated cell walls. *Plant Physiol* 76 414-417.
- Davin LB, Lewis NG (1992) Phenylpropanoid metabolism: biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. In *Recent Advances in Phytochemistry* (Stafford HA, Ibrahim RK, Hrsg.), Bd. 26, Phenolic Metabolism in Plants, Plenum Press, New York, 325-375.
- Davis BJ (1964) Disc electrophoresis II: method and application to human serum protein. *Ann NY Acad Sci* 121 404-427.
- Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM (1989) Data for biochemical research, 3. Aufl., Clarendon Press, Oxford.
- Dercks W, Creasy LL (1989) The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol Mol Plant Pathol* 34 189-202.
- Dixon R (1986) The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biol Rev* 61 239-291.
- Doddrell DM, Pegg DT, Bendall MR (1982) Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfer. *J Magn Reson* 48 323-327.
- Doster MA, Bostock RM (1988) Quantification of lignin formation in almond bark in responses to wounding and infection by *Phytophthora* species. *Physiol Biochem* 78 473-477.

- Ebel J (1986) Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annu Rev Phytopathol* 24 235-264.
- Eberhardt TL, Bernards MA, He L, Davin LB, Wooten JB, Lewis NG (1993) Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda* - *in situ* characterization of a gymnosperm lignin. *J Biol Chem* 268 21088-21096.
- Edwards M, Dea ICM, Bulpin PV, Reid JSG (1986) Purification and properties of a novel xyloglucan-specific *endo*-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucanase from germinated nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.). *J Biol Chem* 261 9489-9494.
- Edwards VT, Hutson DH (1986) The disposition of plant xenobiotic conjugates in animals. In *Xenobiotic Conjugation Chemistry* (Paulson GD, Caldwell J, Hutson DH, Menn JJ, Hrsg.), ACS Symp. Ser. Nr. 299, American Chemical Society, Washington, 322-340.
- Eom TJ, Meshitsuka G, Ishizu A (1989) Side-chain structures of lignin in the differentiating xylems. *Mokkuzai Gakkaishi* 35 820-825.
- Erdtman H (1957) Outstanding problems in lignin chemistry. *Ind Eng Chem* 49 1385-1386.
- Esser HO (1986) Comparative aspects of herbicide metabolism. *Xenobiotica* 16 1031-1045.
- Eulitz M, Murphy C, Weiss DT, Solomon A (1991) Serological and chemical differentiation of human λ III light chain variable regions. *J Immunol* 146 3091-3096.
- Faix O (1993) Fourier transform infrared spectroscopy. In *Methods in Lignin Chemistry* (Lin SY, Dence CW, Hrsg.) Springer Verlag, Berlin, pp. 81-109.
- Fengel D, Wegener G (1979) Hydrolysis of polysaccharides with trifluoroacetic acid and its application to wood and pulp analysis. In *Advances in Chemistry Series* (Brown RD, Jurasek L, Hrsg.), Vol. 181, pp. 145-158.
- Frear DS (1968) Herbicide metabolism in plants: I. purification and properties of UDP-glucoside: arylamine N-glucosyl-transferase from soybean. *Phytochemistry* 7 381-390.
- Frear DS, Swanson HR, Tanaka FS (1972) Herbicide metabolism in plants. In *Recent Advances in Phytochemistry* (Runeckles VC, Tso TS, Hrsg.) Bd. 5, Academic Press, New York, pp. 225-246.
- Freudentberg K (1965) Lignin: its constitution and formation from *p*-hydroxycinnamyl alcohols. *Science* 148 595-600.
- Freudentberg K (1968) The constitution and biosynthesis of lignin. In *Constitution and Biosynthesis of Lignin* (Freudentberg K, Neish AC, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin.
- Fry SC (1986) Crosslinking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol* 37 165-186.
- Fry SC (1988) The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman, London.
- Fry SC (1989) Analysis of cross-links in the growing cell walls of higher plants. In *Modern Methods in Plant Analysis* (Linskens HS, Jackson JS, Hrsg.) Series Bd. 10, Springer Verlag, Berlin, pp.1-42.

- Fry SC, Miller JG (1989) Toward a working model of the growing plant cell wall: phenolic cross-linking reaction in the primary cell walls of dicotyledons. In *Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation*. (Lewis NG, Paice MG, Hrsg.) ACS Symp. Ser. 399, American Chemical Society, Washington, pp.33-46.
- Fukuda T, Mott RL, Harada C (1988) Studies on tissue culture of tree-cambium. XI. Characterization of lignin in suspension-cultured cells of loblolly pine. *Mokuzai Gakkaishi* 34 149-154.
- Fukushima K, Terashima N (1990) Heterogeneity in formation of lignin. XIII. Formation of *p*-hydroxyphenyl lignin in various hardwoods visualized by microautoradiography. *J Wood Chem Technol* 10 413-433.
- Fukushima K, Terashima N (1991 a) Heterogeneity in formation of lignin. XV. Formation and structure of lignin in compression wood of *Pinus thunbergii* studied by microautoradiography. *Wood Sci Technol* 25 371-381.
- Fukushima K, Terashima N (1991 b) Heterogeneity in formation of lignin. XIV. Formation and structure of lignin in differentiating xylem of *Ginkgo biloba*. *Holzforschung* 45 87-94.
- Galliano H, Heller W, Sandermann H (1993 a) Ozone induction and purification of spruce cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Phytochemistry* 32 557-563.
- Galliano H, Cabané M, Eckerskorn C, Lottspeich F, Sandermann H, Ernst D (1993 b) Molecular cloning, sequence analysis and elicitor-/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Mol Biol* 23 145-156.
- Gaspar T, Penel C, Castillo FJ, Greppin H (1985) A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol Plant* 64 418-423.
- Glerer J, Ljunggren S (1979) The reactions of lignins during sulfate pulping. XI. The kinetics of the cleavage of B-O-aryl ether linkages in structures containing carbonyl groups. *Svensk Papperstidn* 82 71-81.
- Glatzel H, Meßner B, Bahnweg G, Heller W, Lange BM, Sandermann H (1993) Effects of fungal elicitor and ozone on lignin biosynthesis in spruce cell cultures. In *International Scientific Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*, Freising-Weihenstephan, V 1.
- Glatzel H (1995) Untersuchungen zur Elicitor-induzierten Ligninbiosynthese in Fichten-Zellkulturen, Dissertation, Universität München.
- Graham MY, Graham TL (1991) Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. *Plant Physiol* 97 1445-1455.
- Grisebach H (1981) Lignins. In *The Biochemistry of Plants*, Bd. 7, Secondary Plant Products (Conn EE, Hrsg.), Academic Press, New York, pp. 457-478.
- Hammerschmidt R, Bonnen AM, Bergstrom GC, Baker K (1985) Association of epidermal lignification with nonhost resistance of cucurbits to fungi. *Can J Bot* 63 2393-2398.
- Hanley AB, Russel WR, Chesson A (1993) Formation of substituted truxillic and truxinic acids in plant cell walls - a rationale. *Phytochemistry* 33 957-960.

- Haque A, Weisgerber I, Klein W (1976) Beiträge zur ökologischen Chemie. CXXV. Buturon-¹⁴C bound residue complex in wheat plants. *Chemosphere* 3 167-172.
- Hargreaves J, Keon JPR (1986) Cell wall modifications associated with resistance of cereals to fungal pathogens. In *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (Bailey JA, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, pp. 133-140.
- Harkin JM, Obst JR (1973) Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180 296-298.
- Harms H, Langebartels C (1986) Standardized plant cell suspension test systems for an ecotoxicologic evaluation of the metabolic fate of xenobiotics. *Plant Sci* 45 157-165.
- Harvey J (1983) The fate of pesticide plant metabolites in vertebrates. In *Pesticide Chemistry. Human Welfare and the Environment* (Miyamoto J, Kearney PC, Hrsg.), Bd. 3, Pergamon Press, Oxford, pp. 369-374.
- Heller W, Rosemann D, Pearce RB, McLeod AR, Sandermann H (1990 a) Polyphenol metabolism in Scots pine and Sitka spruce: effects of ozone and sulfur dioxide in the Liphook open-air fumigation experiment. International Conference on Acidic Deposition, Glasgow, Sept. 1990, p. 174.
- Heller W, Rosemann D, Osswald WF, Benz B, Schönwitz R, Lohwasser K, Kloos M, Sandermann H (1990 b) Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.); towards 14-months exposure to ozone and acid mist. I. Effects on polyphenol and monoterpene metabolism. *Environ Pollut* 64 353-366.
- Higuchi T, Ogino K, Tanashi M (1971) Effect of polysaccharides on dehydropolymerization of coniferyl alcohol. *Wood Res* 51 1-11.
- Higuchi (1985) Biosynthesis of lignin. In *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components* (Higuchi T, Hrsg.), Academic Press, New York, pp. 141-160.
- Hubbard TF, Schultz TP, Fisher TH (1992) Alkaline hydrolysis of nonphenolic β -O-4 lignin model dimers: substituent effects on the leaving phenoxide in neighboring group vs direct nucleophilic attack. *Holzforschung* 46 315-320.
- Hutzinger O, Veerkamp W (1981) Xenobiotic chemicals with pollution potential. In *Microbial Degradation of Xenobiotic and Recalcitrant Compounds* (Leisinger T, Cook AM, Hütter R, Nüesch J, Hrsg.), FEMS Symp. Nr. 12, Academic Press, London, pp. 3-45.
- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol* 104 315-320.
- Ikemeyer D, Büttner P, Barz W (1993) Seasonal changes in the activities of apoplastic, cytoplasmic, ionically and covalently bound isoperoxidases from Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) needles: a comparison between three collection sites with different ambient ozone concentrations. *Z Naturforsch* 48c 903-910.
- Industrieverband Agrar e.V. (Hrsg.), Autorenkollektiv (1992) Der Pflanzenschutzmarkt. In *Jahresbericht 1991/1992*, Frankfurt, p. 7.
- Ingestad T (1959) Studies on the nutrition of forest tree seedlings. II. Mineral nutrition of spruce. *Physiol Plant* 12 568-593.

- James RL, Cobb FW, Miller PR, Parmeter JR (1980) Effects of oxidant air pollution on susceptibility of pine roots to *Fomes annous*. *Phytopathology* 70 560-563.
- Jarvis MC (1984) Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell Environ* 7 153-164.
- Kangajärvi J, Talvinen J, Utraiainen M, Karjalainen R (1994) Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ* 17 783-794.
- Kaufman DD, Still GG, Paulson GD, Bandal SK (Hrsg.) (1976) Bound and conjugated pesticide residues, ACS Symp. Ser. Nr. 29, American Chemical Society, Washington.
- Khan SU, Dupont S (1987) Bound pesticide residues and their bioavailability. In *Pesticide Science and Technology* (Greenalgh R, Roberts TR, Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 417-420.
- Khan SU, Kacew S, Dupont S, Stratton GD, Wheeler WB (1987) Bioavailability in rats of bound residues from radishes treated with either radiolabeled dieldrin or carbofuran. *J Agric Food Chem* 35 89-93.
- Khan SU, Kacew S, Akhtar MH (1990) Bound ^{14}C residues in stored wheat treated with [^{14}C] deltamethrin and their bioavailability in rats. *J Agric Food Chem* 38 1077-1082.
- Kneusel RE, Mattern U, Nicolay K (1989) Formation of trans-caffeoyl-CoA from trans-4-coumaroyl-CoA by Zn^{2+} -dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Arch Biochem Biophys* 269 455-462.
- Korte F. (Hrsg.) (1987) *Lehrbuch der ökologischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kühnl T, Koch U, Heller W, Wellmann E (1989) Elicitor induced S-adenosyl-L-methionine: caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase from carrot cell suspension cultures. *Plant Sci* 60 21-25.
- Lagrimini LM, Rothstein S (1987) Tissue specificity of tobacco peroxidase isoenzymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 84 438-442.
- Lam TBT, Iiyama K, Stone BA (1990) Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: taxonomic and structural consideration. In *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminantes* (Akin DE, Ljunmdahl MG, Wilson RJ, Harris PJ, Hrsg.), Elsevier Press, New York, pp. 43-69.
- Lamoureux GL, Rusness DG (1986) Xenobiotic conjugation in higher plants. In *Xenobiotic Conjugation Chemistry* (Paulson GD, Caldwell J, Hutson DH, Menn JJ, Hrsg.), ACS Symp. Ser. Nr. 299, American Chemical Society, Washington, pp.62-105.
- Lamport DTA, Northcote DH (1960) Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants. *Nature* 188 665-666.
- Lamport DTA (1967) Hydroxyproline-O-glycosidic linkage of the plant cell wall glycoprotein extensin. *Nature* 216 1322-1324.
- Lamport DTA and Epstein L (1983) A new model for the primary cell wall. A concatenated extensin-cellulose network. In *Proc. Second Annu. Plant Biochem. Physiol. Symp.*, Columbia-Missouri, pp. 73-83.

- Langebartels C, Harms H (1986) Plant cell suspension cultures as test systems for an ecotoxicologic evaluation of chemicals: growth inhibition effects and comparison with the metabolic fate in intact plants. *Angew Bot* 60 113-123.
- Langebartels C, Heller W, Kerner K, Leonardi S, Rosemann D, Schraudner M, Trost M, Sandermann H (1990) Ozone induced defense reactions in plants. In *Environmental Research with Plants in Closed Chambers* (Payer HD, Pfirman T, Mathy P, Hrsg.) Air Pollution Research Reports of the EC 26, Commission of the European Communities, Brüssel, pp. 358-386.
- Langebartels C, Ernst D, Heller W, Sandermann H (1991) Reactions of trees to air pollutants. In *Ecological Approaches of Environmental Chemicals*, Debrecen, Ungarn 15.-17.4.1991.
- Lapierre C, Monties B, Rolando C (1985) Thioacidolysis of lignin: comparison to acidolysis. *J Wood Chem Technol* 5 277-292.
- Lapierre C, Monties B, Rolando C (1986) Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl lignin fractions. *Holzforschung* 40 113-118.
- Lapierre C, Monties B, Guittet E, Lallemand J-Y (1987) RMN ^{13}C bidimensionnelle des lignines de peuplier: étude des corrélations entre atomes de carbone et réexamen par la méthode inadéquate des attributions des signaux du spectre. *Holzforschung* 41 51-58.
- Lapierre C, Rolando C (1988) Thioacidolyses of pre-methylated lignin samples from pine compression and poplar woods. *Holzforschung* 42 1-4.
- Lapierre C, Pollet B, Monties B, Rolando C (1991) Thioacidolysis of spruce lignins: GC-MS of the main dimers recovered after Raney nickel desulphuration. *Holzforschung* 45 61-68.
- Lapierre C (1993) Application of new methods for the investigation of lignin structure. In *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* (Jung H, Buxton D, Hatfield R, Ralph J, Hrsg.) American Society of Agronomy, Madison, USA, pp. 133-165.
- Laurent FMG (1994) Chloroaniline peroxidation by soybean peroxidases. *Pestic Sci* 40 25-30.
- Lehninger AL (1970) *Biochemistry*, Worth Publishers, New York, p. 56.
- Lenga RE (Hrsg.) (1988) *The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data*, 2. Aufl., Sigma Aldrich Corp., Milwaukee.
- Lesney MS (1989) Growth responses and lignin production in cell suspension cultures of *Pinus elliottii* 'elicited' by chitin, chitosan or mycelium of *Cronartium quercum* f. sp. *fusiforme*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 19 23-31.
- Ludwig CH (1971) Magnetic resonance spectra. In *Lignins. Occurrence, Formation, Structure and Reactions* (Sarkanen KV, Ludwig CH, Hrsg.), Wiley Interscience, New York, pp. 299-344.

- Lüderitz T, Grisebach H (1981) Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamoyl alcohol: NADP⁺ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Biochem* 119 115-124.
- Lüderitz T, Schatz G, Grisebach H (1982) Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of 4-coumarate-CoA ligase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). *Eur J Biochem* 123 583-586.
- Lundquist K (1980) NMR studies of lignins. 4. Investigation of spruce lignin by ¹H NMR spectroscopy. *Acta Chem Scand* 34 21-26.
- Lundquist K, Stern K (1989) Analysis of lignins by ¹H NMR spectroscopy. *J Nord Pulp Pap Res.* 4 210-213.
- Lundquist K (1992) Proton (¹H) NMR spectroscopy. In *Methods in Lignin Chemistry* (Dence CW, Lin SY, Hrsg.) Springer Verlag, Berlin, pp. 242-247.
- Madden LV, Campbell CL (1987) Potential effects of air pollutants on epidemics of plant diseases. *Agric Ecosys Environ* 18 251-262.
- Manning WJ, Keane KD (1988) Effects of air pollutants on interactions between plants, insects, and pathogens. In *Assessment of Crop Loss from Air Pollutants* (Heck WW, Taylor OC, Tingey DT, Hrsg.), Elsevier Applied Science, London, pp. 365-386.
- Matern U, Feser C, Heller W (1984) N-Malonyltransferases from peanut. *Arch Biochem Biophys* 235 218-227.
- Matern U, Kneusel RE (1988) Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica* 16 53-170.
- McCann MC, Roberts K (1991) Architecture of the primary cell wall. In *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form* (Lloyd CW, Hrsg.), Academic Press, San Diego, pp. 109-129.
- McDougall GJ (1991) Cell-wall-associated peroxidases and lignification during growth of flax fibres. *Plant Physiol* 139 182-186.
- Meier H (1987) Kernresonanz-Spektren. In *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 67-192.
- Meßner B, Boll M (1993) Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 34 261-269.
- Meßner B, Boll M (1994) Cell suspension cultures of spruce (*Picea abies*): inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst). *Plant Cell Tiss Orgt Cult* 39 69-78.
- Miksche EG, Yasuda S (1977) Über die Lignine der Blätter und Nadeln einiger Angiospermen und Gymnospermen. *Holzforschung* 31 57-59.
- Moerschbacher BM (1989) Lignin biosynthesis in stem rust infected wheat. In *Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation* (Lewis NG, Paice MG, Hrsg.) ACS Symp. Ser. Nr. 399, American Chemical Society, Washington, pp. 370-382.

- Mollard A, Robert D (1984) Etudes de la lignine pariétale et extracellulaire de *Rosa glauca*. *Physiol Vég* 22 3-17.
- Monties, B (1989) Lignins. In *Methods in Plant Biochemistry* (Dey PM, Harborne JB, Hrsg.) Bd. 1, Academic Press, London, pp. 113-157.
- Moore, TS (1973) An extracellular macromolecular complex from the surface of soybean suspension cultures. *Plant Physiol* 51 529-536.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 473-479.
- Nakatsubo F, Sato K, Higuchi T (1975) Synthesis of guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether. *Holzforschung* 29 165-168.
- Nicholson RL and Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 30 369-389.
- Nimz H, Ebel J, Grisebach H (1975) On the structure of lignin from soybean cell suspension cultures. *Z Naturforsch* 30c 442-444.
- O'Malley D, Whetten R, Bao W, Chen CL, Sederoff RR (1993) The role of laccase in lignification. *Plant J* 4 751-757.
- Organikum, Autorenkollektiv (1986) Organisch-chemisches Grundpraktikum, 16. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, pp. 392-393.
- Pakusch A-E, Kneusel RE, Matern U (1989) *S*-Adenosyl-L-methionine: trans-caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys* 271 488-494.
- Payer H-D, Seckmeyer G (1988) Umweltsimulation für ökotoxikologische Pflanzenexperimente. In *Labor 2000*, Bd. 88-89, Vogel Verlag und Druck KG Würzburg, pp. 196-211.
- Pickett-Heaps JD (1968) Xylem wall deposition. Radioautographic investigations using lignin precursors. *Protoplasma* 65 181-205.
- Pillmoor JB, Roberts TR (1985) Approaches to the study of nonextractable (bound) pesticide residues in plants. *Prog Pestic Biochem Toxicol* 4 85-101.
- Pogany E, Pawlizki K-H, Wallnöfer PR (1990) Formation, distribution and bioavailability of cell wall bound residues of 4-chloroaniline and 2,4-dichlorophenol. *Chemosphere* 21 349-358.
- Poland A, Glover E, Kende AS, DeCamp M, Giandomenico CM (1976) 3,4,3',4'-Tetrachloroazoxybenzene and azobenzene: potent inducers of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Science* 194 627-630.
- Polle A, Pfirrmann T, Chakrabarti S, Rennenberg H (1993) The effects of enhanced ozone and enhanced carbon dioxide concentrations on biomass, pigments and antioxidative enzymes in spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant Cell Environ* 16 311-316.
- Polle A, Otter T, and Seifert F (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106 53-60.
- Ralph J (1988) NMR of lignin model compounds: application of long-range C-H correlations through oxygen. *Holzforschung* 42 273-275.

- Ralph J, Helm RF, Quideau S, Hatfield RD (1992) Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *J Chem Soc Perkin Trans* 2961-2968.
- Reisfeld RA, Lewis UJ, Williams DE (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195 281-283.
- Richter G (1988) Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ride JP (1975) Lignification in wounded leaves in response to fungi and its possible rôle in resistance. *Physiol Plant Pathol* 5 125-134.
- Rippen G (1984) Handbuch des Umweltschutzes (Vogl J, Hrsg.) Bd. 2, II-1 Referenzchemikalien, Ecomed-Verlag, Landsberg.
- Robert D (1993) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. In *Methods in Lignin Chemistry* (Lin SY, Dence CW, Hrsg.) Springer Verlag, Berlin, pp. 250-273.
- Robertsen B, Svalheim O (1990) The nature of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls induced by α -1,4-linked oligogalacturonides. *Physiol Plant* 79 512-518.
- Rouxel T, Kollmann A, Boulidard L, Mithen R (1991) Abiotic elicitation of indole phytoalexins and resistance to *Leptosphaeria maculans* within Brassicaceae. *Planta* 184 271-278.
- Ryan CA (1988) Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. *Biochemistry* 27 8879-8883.
- Sandermann H, Scheel D, v.d.Trenck T (1983) Metabolism of environmental chemicals by plants - copolymerization into lignin. *J Appl Polym Sci* 37 407-420.
- Sandermann H (1987) Pestizid-Rückstände in Nahrungspflanzen. *Naturwiss* 74 573-578.
- Sandermann H, Arjmand M, Gennity I, Winkler R (1990) Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites. *J Agric Food Chem* 38 1877-1880.
- Sandermann H, Schmitt R, Eckey H, Bauknecht T (1991) Plant biochemistry of xenobiotics: isolation and properties of soybean *O*- and *N*-glucosyl and *O*- and *N*-malonyl-transferases for chlorinated phenols and anilines. *Arch Biochem Biophys* 287 341-350.
- Sandermann H, Musick TJ, and Aschbacher PW (1992) Animal bioavailability of a 3,4-dichloroaniline-lignin metabolite fraction from wheat. *J Agric Food Chem* 40 2001-2007.
- Sandermann (1994) Plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 4 225-241.
- Sandermann H, Ernst D, Heller W, Langebartels C (1994) Biochemical markers for stress. Detection and ecophysiology. In *Design and Execution of Experiments on CO₂ Enrichment*. (Schulze E-D, Mooney HA, Hrsg.) Ecosystems Research Report Series No. 6, Commission of the European Communities, pp. 45-51.
- Sarkanen KV, Hergert HL (1971) Classification and distribution. In *Lignins. Occurrence, Formation, Structure and Reactions* (Sarkanen KV, Ludwig CH, Hrsg.), Wiley Interscience, New York, pp. 43-94.
- Sarkanen KV, Ludwig CH (Hrsg.) (1971) *Lignins. Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, Wiley Interscience, New York.

- Schalbert A, Monties B, Rolando C, Sierra-Escudero A (1986) Formation of ether linkage between phenolic acids and gramineae lignin: a possible mechanism involving quinone methides. *Holzforschung* 40 191-195.
- Schäfer W (1986) Untersuchungen zum Mechanismus des Einbaus von Pentachlorphenol in Weizenlignin, Dissertation, Freiburg.
- Schindler T (1993) Das neue Bild der Zellwand. *Biol uns Zeit* 2 113-120.
- Schmelzer E, Jahnen W, Hahlbrock K (1988) *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 2989-2993.
- Schmidt B, Thiede B, and Rivero C (1994) Metabolism of the pesticide metabolites 4-nitrophenol and 3,4-dichloraniline in carrot (*Daucus carota*) cell suspension cultures. *Pestic Sci* 40 231-238.
- Schmitt R, Sandermann H (1982) Specific localization of β -D-glucoside conjugates of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soybean vacuoles. *Z Naturforsch* 37c 772-777.
- Schneiderbauer AH, Sandermann H (1990) Ozone-induced increase of extensin transcript levels in beech, Norway spruce, and pine. 20th FEBS Meeting, Budapest, Abstract Book No. P-Th 473.
- Schrauwen J (1966) Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an Polyacrylamidsäuren. *J Chromat* 23 177-180.
- Sederoff RR, Campbell MM, O'Malley D, Whetten R (1994) Genetic regulation of lignin biosynthesis and potential modification of wood by genetic engineering in loblolly pine. *In* Recent Advances in Phytochemistry Bd. 28 (Kuroki GW, Stafford HA, Hrsg.), Plenum Press, New York.
- Shimabukuro RH, Lamoureux GL, Frear DS (1982) Pesticide metabolism in plants: reactions and mechanisms. *In* Biodegradation of Pesticides (Matsumura F, Krishna Murti CR, Hrsg.), Plenum Press, New York, pp. 21-66.
- Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5 9-23.
- Simmons KE, Minard RD, Bollag J-M (1989) Oxidative co-oligomerization of guaiacol and 4-chloroaniline. *Environ Sci Technol* 23 115-121.
- Simola LK, Lemmetyinen J, Santanen A (1992) Lignin release and photomixotropism in suspension cultures of *Picea abies*. *Physiol Plant* 84 374-379.
- Sipilä J, Brunow G (1991) On the mechanism of formation of non-cyclic benzyl ethers during lignin biosynthesis. Part 2. The effect of pH on the reaction between β -O-4-type quinone methide and vanillyl alcohol in water-dioxane solutions. The stability of non-cyclic benzyl aryl ethers during lignin biosynthesis. *Holzforschung* 45 275-278.
- Sondheimer E (1961) Possible identity of a fungitoxic compound from carrot roots. *Phytopathology* 51 71-73.
- Sorvari J, Sjöström E, Klemola A, Laine, JE (1986) Chemical characterization of wood constituents, especially lignin, in fractions separated from middle lamella and secondary wall of Norway spruce (*Picea abies*). *Wood Sci Technol* 20 35-51.

- Sterjiades R, Dean JFD, Gamble G, Himmelsbach DS, Eriksson K-EL (1993) Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. *Planta* 190 75-87.
- Still GG (1968) Metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants: the metabolic fate of the 3,4-dichloroaniline moiety. *Science* 159 992-993.
- Still GG, Balba HM, Mansager ER (1981) Studies on the nature and identity of bound chloroaniline residues in plants *J Agric Food Chem* 29 739-746.
- Stone BA (1989) Cell walls in plant-microorganism associations. *Aust J Plant Physiol* 16 5-17.
- Sutherland NL (1976) Nature of propanil bound residues in rice plants as measured by plant fractionation and animal bioavailability experiments. In Bound and Conjugated Pesticide Residues (Kaufman DD, Still GG, Paulson GD, Bandal SK, Hrsg.), ACS Symp. Ser. Nr. 29, American Chemical Society, Washington, pp. 153-155.
- Talbott DL, Ray PM (1992) Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol* 98 369-379.
- Tanaka K, Nakatsubo F, Higuchi T (1979) Reactions of guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether with several sugars. I. Reactions of quinone methide with pyranohexoses. *Mokuzai Gakkaishi* 25 653-659.
- Tatsumi K, Freyer A, Minard RD, Bollag J-M (1994) Enzymatic coupling of chloroanilines with syringic acid, vanillic acid and protocatechuic acid. *Soil Biol Biochem* 26 735-742.
- Terashima N, Seguchi Y (1988) Heterogeneity in formation of lignin. IX. Factors affecting the formation of condensed structures in lignin. *Cell Chem Technol* 22 147-154.
- Terashima N, Fukushima K (1988) Heterogeneity in formation of lignin. XI. An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Sci Technol* 22 259-270.
- Tollier M, Lapierre C, Monties B, Francesh C, Rolando C (1991) Structural variations in synthetic lignins (DHPs) according to the conditions of their preparation. In Proceedings of the 6th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Melbourne, Vol. II, pp. 35-40.
- Turner LB, Müller-Harvey I, McAllan AB (1993) Light-induced isomerization and dimerization of cinnamic acid derivatives in cell walls. *Phytochemistry* 33 791-796.
- v.d.Trenck KT, Hunkler D, and Sandermann H (1981) Incorporation of chlorinated anilines into lignin. *Z Naturforsch* 36 714-720.
- Vance, CP, Kirk, TK, Sherwood, RT (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 18 259-288.
- Walter MH (1992) Regulation of lignification in defense. In Plant Gene Research, Bd 8, Genes Involved in Plant Defense (Boller T, Meins F, Hrsg.), pp. 327-352.
- Westermarck U (1985) The occurrence of *p*-hydroxyphenylpropane units in the middle lamella lignin of spruce (*Picea abies*). *Wood Sci Technol* 19 223-232.

- Whiting P, Goring DAI (1982) Chemical characterization of tissue fractions from the middle lamella and secondary wall of black spruce tracheids. *Wood Sci Technol* 16 261-267.
- Whitmore, FW (1978) Lignin-protein complex catalyzed by peroxidase. *Plant Sci Lett* 13 241-245.
- Whitmore FW (1982) Lignin-protein complex in cell walls of *Pinus elliotii*: amino acid constituents. *Phytochemistry* 21 315-318.
- Winkler R and Sandermann H (1989) Plant metabolism of chlorinated anilines: isolation and identification of N-glucosyl and N-malonyl conjugates. *Pestic Biochem Physiol* 33 239-248.
- Winkler R (1991) Metabolisierung von Chloranilinen in Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) und im Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* Burds., Dissertation, Universität München.
- Worthing CR, Hance RJ (1991) The Pesticide Manual. The British Crop Protection Council Farnham, 9. Auflage.
- Yih RY, McRae DH, Wilson HF (1968) Metabolism of 3',4'-dichloropropionanilide: 3,4-dichloroaniline complex in rice roots. *Science* 161 376-377.
- Yoshikawa M (1978) Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *Nature* 275 546-547.
- Zaprometov MN, Zagorskina NV, Elkin, VV (1993) Comparative study of lignins produced by the tea-plant and by tea-plant derived callus tissues. *Phytochemistry* 32 709-711.
- Ziechmann W, Weichelt T (1977) Chemische Veränderungen am Lignin bei dessen Isolierung. *Z Pflanzenernähr Bodenkd* 140 645-655.
- Ziegler H (1991) Physiologie. In Strasburger - Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 239-469.



Ganz alleine

ist eine Dissertation natürlich nicht durchzustehen.

Deshalb möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. H. Sander mann für die Überlassung des vielschichtigen Themas, für die Unterstützung bei den Auslandsaufenthalten und die Betreuung der Arbeit.

Des weiteren gilt mein Dank (in alphabetischer Reihenfolge):

Herrn Dr. M. Eulitz (Institut für klinische Molekularbiologie der GSF) für die Durchführung der Aminosäureanalyse,

den Mitarbeitern von *Herrn Prof. D. Fengel* (Institut für Holzforschung der Universität München) für die Analyse der Kohlenhydratzusammensetzung in den Zellkulturproben,

Frau Dr. Judith Fliegmann für die Einführung in die Gelelektrophorese von Peroxidasen und deren *in situ*-Nachweis. Als Mitglied der 12-Uhr-Fraktion war sie integraler Bestandteil der angenehmen Gesellschaft beim Mittagessen,

Herrn Dr. Werner Gläßgen für die gehaltvolle musikalische Untermalung der trockenen Laborarbeit. Als weiterer ständiger Teilnehmer an den 12-Uhr-Mittagessen sorgte er für frischen Wind im Arbeitsalltag,

Frau Heike Glatzel und Frau Kirsten Minkhart für die Überlassung von Pilzmyzel bzw. für die Präparation eines Teils des *Rhizosphaera kalkhoffii*-Elicitors,

Herrn Dr. Werner Heller für seine stete Diskussionsbereitschaft, sowie für einige wertvolle Hinweise und Tips,

Herrn Dr. Norbert Hertkorn und Frau Eva Schindlbeck (Institut für Ökologische Chemie der GSF) für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Aufnahme der NMR-Spektren. Ohne diese Bereitschaft wäre die Arbeit nicht zu bewältigen gewesen,

Frau Prof. Catherine Lapierre und Dr. B. Monties, in deren Labors ich die Thioacidolyse erlernt habe. Diese Methode war von entscheidender Wichtigkeit bei der strukturellen Charakterisierung der Lignine. Die Diskussionen mit beiden Wissenschaftlern haben sehr zum Verständnis der Methoden bei der Untersuchung komplexer polymerer Strukturen der pflanzlichen Zellwand beigetragen,

Herrn Dr. H. Lerche, in dessen Labor die Elementaranalysen durchgeführt wurden,

Herrn Robert "Frankieboy" May für seine Geduld während der gemeinsamen Nutzung der HPLC und die hervorragende Kooperation bei der Erarbeitung verschiedener HPLC- und HPSEC-Methoden. Die Diskussionen über Tricks bei chemischen Synthesen waren sehr nützlich,

Herrn Dr. Burkhard Meßner für das Anlegen und die Kultivierung der Fichten-Suspensionskulturen,

Herrn Dr. Jörg-Peter Schnitzler für die Anleitung zur Histochemie phenolischer Polymere in Fichten-Keimlingen,

allen nicht genannten Laborkollegen, die sich um eine gute Zusammenarbeit und eine freundliche Atmosphäre verdient gemacht haben,

meinen Eltern, die mir durch ihre vielfältige Unterstützung einen wissenschaftlichen Werdegang erlaubt haben.

Danke, *Iris und Malte*.