# HINOKININ BIOSYNTHESIS
# IN
# *Linum strictum* ssp. *corymbulosum*

**Inaugural-Dissertation**

submitted to The Faculty of Natural Sciences
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
in fulfillment of the requirements for the degree of
Dr. rer. nat.

by
**Ürün Bayındır**
from İstanbul

Referee: Prof. Dr. A. Wilhelm Alfermann
Co-referee: Prof. Dr. Rolf Wagner

Berichte aus der Biologie

**Ürün Bayindir**

# HINOKININ BIOSYNTHESIS IN *Linum strictum* ssp. *corymbulosum*

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Shaker Verlag
Aachen 2008

**Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek**
The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at http://dnb.d-nb.de.

Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss., 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.



Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-6871-8
ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen
Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9
Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

*For the memory of my Father...*

*Sevgili Babamın anısına...*

# CONTENTS

## Summary

Lignans are a class of phenolic compounds that are composed of two phenylpropanoid units. The biologically active and potential drug component lignan (-)-hinokinin was found in hairy root, callus and suspension cultures of *L. strictum* ssp. *corymbulosum* beside other plant species. Two different pathways are plausible for hinokinin biosynthesis. In both pathways (+)-pinoresinol is the central intermediate. In the first pathway, (+)-pinoresinol is reduced enantiospecifically via (+)-lariciresinol to (-)-secoisolariciresinol by a pinoresinol-lariciresinol reductase (PLR). (-)-Secoiolariciresinol is oxidized by secoisolariciresinol dehydrogenase (SDH) to give (-)-matairesinol, from which (-)-hinokinin can be synthesized by the formation of two methylenedioxy bridges. In the second possible pathway, (+)-pinoresinol serves as the substrate for the formation of two methylenedioxy bridges by piperitol-sesamin synthase (PSS) to give (+)-sesamin, which is then converted to (-)-dihydrocubebin with a two-step-reduction reaction similar to the reductions catalyzed by PLR. The last step to form (-)-hinokinin is a dehydrogenation reaction like the one catalyzed by the SDH.

In order to clarify which pathway is involved in (-)-hinokinin biosynthesis, cDNAs have been cloned encoding proteins possibly involved in all described reaction steps. One clone with highest similarity to PLRs, and four clones with highest similarities to phenylcoumaran benzylic ether reductases (PCBERs), which are in the same reductase family with PLRs, were isolated. Incubation of their recombinant proteins with pinoresinol or dehydrodiconiferyl alcohol as substrates proved their functions as PLR and PCBER. The PLR-Lc is enantiospecific for the conversion of (+)-pinoresinol to (-)-secoisolariciresinol, which can be further converted to give (-)-hinokinin. Hairy root lines were transformed with two ihpRNAi constructs to suppress *plr* and *pcber* gene expressions, respectively, to prove the involvement of these genes in (-)-hinokinin biosynthesis. The mRNA level of *plr*-Lc and *pcber*-Lc were significantly reduced in the hairy root lines with the *plr*-ihpRNAi and the *pcber*-ihpRNAi construct, respectively. Hinokinin accumulation was reduced to undetectable levels with the *plr*-ihpRNAi construct, but not with the *pcber*-ihpRNAi construct, proving the involvement of PLR-Lc and the first hypothetical pathway via (-)-matairesinol in the biosynthesis of (-)-hinokinin.

## Zusammenfassung

Lignane gehören zu einer Klasse phenolischer Verbindungen, die aus zwei Phenylpropan-Einheiten bestehen. Das Lignan (-)-Hinokinin wurde in Hairy Roots, Kallus- und Zellkulturen von *L. corymbulosum* (Mohagheghzadeh et al., 2006) nachgewiesen. Ausgehend von (+)-Pinoresinol sind zwei Wege zur Biosynthese von (-)-Hinokinin denkbar. Der erste Weg beginnt mit der enantiospezifischen Reduktion von (+)-Pinoresinol über (+)-Lariciresinol zu (-)-Secoisolariciresinol durch die Pinoresinol-Lariciresinol Reduktase (PLR). In einem nächsten Schritt wird (-)-Secoisolariciresinol durch die Secoisolariciresinol Dehydrogenase (SDH) zu (-)-Matairesinol oxidiert, aus dem wiederum (-)-Hinokinin durch die Bildung zweier Methylendioxy-Brücken entstehen kann. Der zweite mögliche Syntheseweg beginnt mit der Umsetzung von (+)-Pinoresinol zu (+)-Sesamin mit Hilfe einer Piperitol-Sesamin Synthase (PSS) durch die Bildung zweier Methylendioxy-Brücken. (+)-Sesamin kann in einer zweistufigen Reduktion entsprechend der PLR-katalysierten Reaktion zu (-)-Dihydrocubebin umgesetzt werden. Der letzte Schritt zur Bildung von (-)-Hinokinin würde über eine Dehydrogenierung erfolgen, die der SDH-katalysierten Reaktion ähnelt.

Um herauszufinden, welcher der beiden Wege zur Bildung von (-)-Hinokinin relevant ist, sollten cDNAs kloniert werden, die für die möglicherweise relevanten Proteine kodieren. Hierbei wurden vier Klone isoliert, deren vollständige Sequenzen starke Ähnlichkeit zu Phenylcumaranbenzylether Reduktasen (PCBERs) aufweisen. Ein weiterer Klon hat große Ähnlichkeit zu PLRs. Durch Verwendung der Substrate Dehydrodiconiferylalkohol bzw. Pinoresinol konnte gezeigt werden, dass es sich bei den rekombinanten Proteinen tatsächlich um eine PCBER bzw. PLR handelt. Die PLR ist enantiospezifisch für die Umsetzung von (+)-Pinoresinol zu (-)-Secoisolariciresinol, das dann in (-)-Hinokinin überführt werden kann. Mit Hilfe der beiden Konstrukte *pcber*-ihpRNAi und *plr*-ihpRNAi und durch *Agrobacterium rhizogenes* wurden Sprosse von *L. corymbulosum* transformiert, um den Einfluss dieser Gene auf die (-)-Hinokinin-Biosynthese nachzuweisen. Durch Verwendung dieser Konstrukte in Hairy-Root-Klonen konnte gezeigt werden, dass sich die mRNA Level von *plr*-Lc und *pcber*-Lc signifikant reduzieren ließen. Zudem wurde durch Verwendung des *plr*-ihpRNAi-Konstruktes die Konzentration von Hinokinin unter die Nachweisgrenze reduziert, während sie durch Einsatz des *pcber*-ihpRNAi-Konstruktes nicht beeinflusst wurde. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die PLR-Lc in der Biosynthese von (-)-Hinokinin involviert ist und somit der erste Weg mit Matairesinol als Zwischenprodukt der wahrscheinliche Weg ist.

## List of abbreviations

| | |
|---|---|
| amp | Ampicillin |
| app. | Approximately |
| bp | Base pairs |
| cDNA | Complementary DNA |
| CytP450 | Cytochrome P450 |
| DDC | Dehydrodiconiferyl alcohol |
| DDH | Dihydrocubebin dehydrogenase |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DW | Dry weight |
| e.g. | Exempli gratia, for instance |
| fup$H_2O$ | Filtered ultrapure water |
| FW | Fresh weight |
| gDNA | Genomic DNA |
| h | Hours |
| HAPLO | Haplomyrfolin |
| HAS | Haplomyrfolin synthase |
| HINO | Hinokinin |
| HS | Hinokinin synthase |
| IAA | Indole-3-acetic acid |
| IDDC | Isodihydrodehydrodiconiferyl alcohol |
| kDa | Kilodalton |
| KPi | Potassium phosphate buffer |
| LARI | Lariciresinol |
| *L. corymbulosum* | *Linum strictum* ssp. *corymbulosum* |
| MATAI | Matairesinol |
| max. | Maximum |
| MDOB | Methylenedioxy bridge-forming |
| min | minutes |
| MJ | Methyl jasmonate |
| NAA | Naphtylacetic acid |
| NADPH | Nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate (reduced) |
| OD | Optical density |
| ORF | Open reading frame |
| p.A. | pro analysi |
| PCBER | Phenylcoumaran benzylic ether reductase |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| pfu | Plaque forming units |
| PINO | Pinoresinol |
| PIPE | Piperitol |
| PLR | Pinoresinol-lariciresinol reductase |
| PLS | Pluviatolide synthase |
| PLU | Pluviatolide |
| PSS | Piperitol-sesamin synthase |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RNase | Ribonuclease |
| rpm | Revolutions per minute |
| RT-PCR | Reverse transcription-PCR |
| sup$H_2O$ | Sterile ultrapure water |
| SDH | Secoisolariciresinol dehydrogenase |
| SDR | Sesamine-dihydrocubebine reductase |
| SDS | Sodiumdodecylsulphate |
| sec | Seconds |
| SECO | Secoisolariciresinol |
| SESA | Sesamin |
| Sol. | Solution |
| spec | Spectinomycin |
| Ta | Annealing temperature |
| Tm | Melting temperature |
| TAE | Tris-Acetate-EDTA buffer |
| up$H_2O$ | Ultrapure water |
| V | Volt |
| v/v | volume/volume |
| w/v | weight/volume |