

In vivo Charakterisierung der
4-Cumarat:CoA Ligase-Familie
in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Björn Hamberger
aus Ränderoth

Köln 2002

Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Hahlbrock
Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt
Prof. Dr. Klaus Harter

Prüfungsvorsitzender:

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Mai 2003

Für meine Eltern Reinhard und Renate Hamberger

Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Cumarat:CoA Ligase
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand), im Weiteren durchgehend <i>als A. thaliana</i> benannt
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
cDNA	komplementäre DNA
CHS	Chalcon Synthase
cM	Centimorgan, Einheit zur Beschreibung der Rekombinationsfrequenz
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
Da	Dalton (= $1,6605655 \times 10^{-27}$ kg)
DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> Stamm DC3000
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioerythol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
F5H	Ferularsäure-5-Hydroxylase
fah	Nullmutante der Ferulat-5-Hydroxylase
G	Guanin
GA	Pflanzenlinie der GARLIC Population (Syngenta)
GFP	"green fluorescent protein"
GUS	β -Glucoronidase
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	mol/l
min	Minute(n)
MOPS	3-(M-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	"messenger"-RNA (Boten RNA)
N	Nukleotid (A, C, G oder T)
nt	Nukleotid(e)

OD	optische Dichte
ori	"origin of replication"
p. A.	zur Analyse
PAL	Phenylalanin Ammonium Lyase
<i>Pc</i>	<i>Petroselinum crispum</i> (Petersilie)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pmg	<i>Phytophthora megasperma</i> f.sp. <i>glycinea</i>
PR-Gene	<i>pathogenesis-related-genes</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>
PVP	Polyvenylpropylen
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm 1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> Stamm DC3000 (<i>avrRpm1</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions PCR
SA	Pflanzenlinie der SiGNAL Population (J. Ecker, SALK Institute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Pflanzenlinie der SLAT Population (J. Jones, Sainsbury Lab)
T	Thymin
tt	"transparent testa"
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
u	Unit (funktionelle Enzymeinheit)
U	Uracil
<i>uidA</i>	GUS-Enzym kodierendes Gen
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
ZI	Pflanzenlinie der ZIGIA Population (E. Wismann et. al. 1998)

Für Aminosäuren wurden die konventionellen Einbuchstaben- bzw. Dreibuchstaben-abkürzungen verwendet.

Englische und lateinische Begriffe und Bezeichnungen wurden im Text kursiv wiedergegeben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Hintergrund der Arbeit	12
1.1.1	Sekundärmetabolite	12
1.1.2	Biochemische und molekulare Evolution	12
1.1.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>A. thaliana</i>) als Modellsystem	14
1.1.4	Klassen von Sekundärmetaboliten in <i>A. thaliana</i>	14
1.1.5	Der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel	16
1.1.6	Manipulation von Stoffwechselwegen	18
1.1.7	Mutanten des Phenylpropanstoffwechsels	20
1.1.8	Problemstellung der Arbeit	21
1.2	Ziele der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Chemikalien, Enzyme und Radioisotope	24
2.2	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	24
2.3	Desoxyoligonukleotide	24
2.4	Bakterienstämme und Plasmide	28
2.5	<i>A. thaliana</i> -Zellsuspensionskultur	29
2.6	Pflanzen und Pflanzenanzucht	29
2.6.1	Kultivierung von <i>A. thaliana</i>	29
2.6.2	Sterile Flüssigkulturen	30
2.6.3	Herbizidselektion transgener Linien mit Bar-Resistenzgen	30
2.6.4	<i>A. thaliana</i> Phenylpropanstoffwechsel-Mutanten: Identifikation und Isolierung	30
2.6.5	Wildtyp und weitere mutagenisierte Linien	34
2.6.6	Erzeugung multipler Mutanten: Kreuzen von <i>A. thaliana</i>	35
2.6.7	Erzeugung multipler Mutanten: Identifizierung von Rekombinationsereignissen	35
2.6.8	Morphologische Untersuchungen	37
2.7	Molekularbiologische Standardmethoden	38
2.7.1	Restriktions-Endonukleasespaltung	38
2.7.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.7.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
2.7.4	Isolierung von Plasmid-DNA	38
2.7.5	Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA	39
2.7.6	Isolierung genomischer DNA	39
2.7.7	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	40
2.7.8	Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	40
2.7.9	Herstellung nichtradioaktiver Hybridisierungssonden	41
2.7.10	Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren	41
2.7.11	RT-PCR zur Expressionsanalyse von <i>At4CL4</i>	42
2.7.12	Rechnergestützte Sequenzanalysen	43
2.7.13	Herstellung und Analyse transgener Pflanzen	48
2.8	Proteinanalytik: Expression von <i>At4CL4</i> in <i>E. coli</i>	50

2.8.1	Herstellung der Expressionsvektoren	50
2.8.2	Expression der Proteine	54
2.8.3	Herstellung von Proteinextrakten.....	54
2.8.4	Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine über Nickel-NTA-Agarose ..	54
2.8.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	54
2.8.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	55
2.8.7	Coomassie-Färbung	55
2.8.8	Silber-Färbung	55
2.8.9	Protein-Blot-Analyse	55
2.8.10	Immunologische Detektion von Proteinen	56
2.8.11	Bestimmung der 4CL4-Aktivität	56
2.9	Sekundärstoffanalyse	57
2.9.1	Aufarbeitung von pflanzlichem Gewebe	57
2.9.2	Extraktion von Sekundärmetaboliten	58
2.9.3	Analytische Hochleistungs-dünnschichtchromatographie.....	59
2.9.4	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	59
3	Ergebnisse	61
3.1	In silico Analysen	61
3.1.1	4CLs im Pflanzenreich	61
3.1.2	Die Familie der <i>A. thaliana</i> 4-Cumarat:CoA Ligasen (<i>At4CLs</i>).....	61
3.1.3	Die Familie der Reis <i>Os4CLs</i>	62
3.1.4	Ähnlichkeiten der <i>At4CLs</i> und innerhalb der pflanzlichen 4CL-Familie .	63
3.1.5	Phylogenetische Analysen.....	64
3.1.6	Genomstrukturanalyse in <i>A. thaliana</i>	67
3.1.7	Genstrukturanalyse der <i>At4CLs</i>	70
3.1.8	Promotoranalyse der <i>At4CLs</i>	71
3.1.9	Entwicklung einer Konsensusmatrix zur Identifikation und Evaluierung mutmaßlich <i>cis</i> -regulatorischer Elemente P, A, und L in Promotoren von Phenylpropanstoffwechsel-Genen	73
3.1.10	W-Boxen in <i>At4CL4</i>	75
3.2	In vitro Analysen	76
3.2.1	<i>At4CL4</i> Isolierung	76
3.2.2	Heterologe Expression von <i>At4CL4</i> mit dem pQE-70 System.....	76
3.2.3	Heterologe Expression von <i>At4CL4</i> mit dem pET-30 System	78
3.2.4	Bestimmung der katalytischen Aktivität des rekombinanten <i>At4CL4</i> Proteins	79
3.2.5	Expressionsstudien.....	85
3.3	Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung von <i>A. thaliana</i> Nullmutanten im Phenylpropanstoffwechsel.....	90
3.3.1	Die <i>At4CL1</i> -Nullmutante <i>ZI4cl1</i>	91
3.3.2	Identifizierung und Isolierung einer weiteren <i>At4CL1</i> -Nullmutante	91
3.3.3	Identifizierung und Isolierung von <i>At4CL2</i> -Nullmutanten.....	91
3.3.4	Identifizierung und Isolierung von <i>At4CL3</i> -Nullmutanten.....	93
3.3.5	Identifizierung und Isolierung einer <i>At4CL4</i> -Nullmutante	94
3.3.6	Ferulat-5-Hydroxylyase (<i>AtF5H</i>) und die <i>fah1-2</i> Mutante	95
3.3.7	Zimtsäure-4-Hydroxylase (<i>AtC4H</i>) und mögliche Mutantenlinien	96

3.3.8	Übersicht der isolierten Mutanten des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels	97
3.3.9	Segregationsanalyse zur Bestimmung der Anzahl von Integrationen ...	99
3.4	Mehrfachmutanten.....	100
3.4.1	Erzeugung der ZI4cl1 x SL4cl3 Doppelmutante	102
3.4.2	Erzeugung von ZI4cl1 x SL4cl2-Doppelmutantenlinien	103
3.5	Charakterisierung der Nullmutantenlinien.....	105
3.5.1	Morphologische Vergleiche und entwicklungspezifische Untersuchungen der Einzel-Mutantenlinien	105
3.5.2	Morphologische Vergleiche und entwicklungspezifische Untersuchungen einer ausgewählte Mehrfachmutanten-Linie: Charakterisierung der At4CL1/At4CL2-Doppelnullmutante	108
3.6	Biochemische Charakterisierung der At4CL-Einzelnullmutanten	111
3.6.1	Das At4CL1-Gen: Untersuchung der Nullmutante ZI4cl1	111
3.6.2	Das At4CL2-Gen: Untersuchung der Nullmutante SL4cl2.....	113
3.6.3	Das At4CL3-Gen: Untersuchungen an Nullmutanten.....	114
3.6.4	Das At4CL4-Gen: Untersuchung der Nullmutante SL4cl4.....	121
3.7	Biochemische Charakterisierung ausgewählter Mehrfachmutanten-Linien	121
4	Diskussion	124
4.1	In silico Analysen.....	125
4.1.1	Die Familie der At4CLs.....	125
4.1.2	Phylogenetische Analysen.....	125
4.1.3	Die Familie der Os4CLs.....	126
4.1.4	Genomanalyse von <i>A. thaliana</i>	127
4.1.5	Genstrukturanalyse der At4CLs.....	128
4.1.6	Promotoranalyse der At4CLs.....	129
4.1.7	Rekonstruktion der Evolution der At4CLs.....	132
4.2	In vitro Analysen	135
4.2.1	Erste Serie: Heterologe Expression von At4CL4 mit dem pQE-70 System	135
4.2.2	Zweite Serie: Heterologe Expression von At4CL4 mit dem pET-30 System	136
4.2.3	Enzymkinetik von heterolog exprimierter At4CL4	136
4.2.4	Sinapat-Aktivierung, eine seltene Kuriosität?	137
4.2.5	Gewebe- und Stimulus-spezifische Expressionsanalysen	138
4.3	In vivo Analysen.....	139
4.3.1	Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung von At4CL-Nullmutanten	139
4.3.2	Untersuchungen der Mutanten	140
4.3.3	Charakterisierung einer Mehrfachmutante	143
5	Zusammenfassung	146
6	Ausblick	149
7	Literaturverzeichnis.....	150
8	Anhang.....	159

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: <i>At4CLs</i> , Pförtner im postulierten Netzwerk des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels.	17
Abbildung 2: Nachweis einer T-DNA oder Transposonintegration im untersuchten Gen mittels der PCR.	33
Abbildung 3: Herbizid-Selektion von Keimlingen.	35
Abbildung 4: Schema der Klonierungsstrategie <i>At4CL4</i> für heterologe Expression in <i>E. coli</i> .	51
Abbildung 5: Schema der alternativen Klonierungsstrategie <i>At4CL4</i> für heterologe Expression in <i>E. coli</i> .	53
Abbildung 6: Genomische Anordnung von <i>At4CL2</i> und <i>At4CL4</i> .	61
Tabelle 1: Vergleich von 4-Cumarat:CoA Ligasen aus <i>A. thaliana</i> mit Verwandten und einigen ausgewählten Vertretern anderer Organismen.	63
Abbildung 7: Ungewurzelte Darstellung der phylogenetischen Analyse annotierter und charakterisierter 4CLs.	65
Abbildung 8: Zeitaufgelöste gewurzelte Baumdarstellung der phylogenetischen Analyse annotierter und charakterisierter 4CLs.	66
Abbildung 9: Segmentduplikationen im <i>A. thaliana</i> Genom.	68
Abbildung 10: Ausschnitte der durch eine Segment-Duplikation erzeugten <i>At4CL1</i> und <i>At4CL2/At4CL4</i> tragenden chromosomalen Bereiche.	69
Abbildung 11: Organisation der Genstruktur der <i>At4CL</i> -Familie. Dargestellt sind die Gene in ansteigender Komplexität ihrer Intron-Exon Strukturen.	70
Abbildung 12: Promotorstruktur der <i>At4CLs</i> .	72
Abbildung 13: Matrixlogos der Boxen P, A und L zur Darstellung des Konsensus und dessen Qualität.	74
Abbildung 14: Position mutmaßlicher W-Boxen im <i>At4CL4</i> Promotor.	75
Abbildung 15: Multititerplatten-Test auf 4CL-Aktivität mit Zimtsäure-Derivaten als Substrat.	77
Abbildung 16: Westernblot von 10 Klonen der pQE-70 <i>At4CL4</i> Expressionsserie, <i>E. coli</i> Rohextrakt.	78
Abbildung 17: Heterologe Expression von <i>At4CL4</i> -His ₆ in <i>E. coli</i> und Detektion des aufgereinigten rekombinanten Proteins.	79
Abbildung 18: Zimtsäure und ihre Derivate, eingesetzt in der Analyse der <i>At4CL4</i> -Enzymeigenschaften.	80
Abbildung 19: Aktivität der <i>At4CL4</i> gegenüber 4-Cumarat, Kaffeeat, Ferulat und Sinapat.	81
Tabelle 2: Michaelis-Menten-Konstanten (Km), spezifische Aktivitäten und relative Spezifitäten von <i>At4CL4</i> .	83
Abbildung 20: Kinetische Eigenschaften der heterolog exprimierten <i>At4CL4</i> gegenüber nicht-4-hydroxylierten Substraten.	84
Abbildung 21: Übersicht der Substratspezifität der heterolog exprimierten und aufgereinigten <i>At4CL4</i> .	85
Abbildung 22: Kontrolle der RT-PCR Oligonukleotide auf klonierter cDNA.	87
Abbildung 23: Expressionsanalyse der <i>At4CL</i> -Familie durch RT-PCR.	88
Abbildung 24: Expressionsanalyse der <i>At4CL</i> -Familie in Licht- und Elicitor-behandelter Zellkultur.	89
Abbildung 25: PCR-Southern zur Suche nach <i>At4CL2</i> -Integrationslinien in der SLAT-Population.	92
Abbildung 26: HPTLC-Analyse unterschiedlicher Mutanten des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels.	96
Abbildung 27: Übersicht zu allen isolierten <i>At4CL</i> -Mutanten mit den Positionen der Insertionen innerhalb der Gene.	99

Abbildung 28: Übersicht zu den Kreuzungen der Linien ZI4cl1, SL4cl2, SL4cl3 und tt4(2YY6).	101
Abbildung 29: Physikalische und genetische Position der At4CLs.	102
Abbildung 30: Herbizidbehandlung zur Selektion von F1 Nachkommen einer ZI4cl1 x SL4cl3 Kreuzung.	103
Abbildung 31: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten einer Analyse von 7 Linien der Mehrfachmutanten.	104
Abbildung 32: Vergleich unter Licht- und Dunkelbedingungen angezogener WT- und SL4cl2-Keimlinge.	106
Abbildung 33: Färbung der Samenschale durch Oxidierung eingelagerter Flavonoide.	107
Abbildung 34: Genotypen und Phänotypen einer segregierenden ZI4cl1/SL4cl2/fah1-2-Population (Alter 6 Wochen).	109
Abbildung 35: 12 Wochen alte F2-Nachkommen einer segregierenden ZI4cl1/SL4cl2/fah1-2-Population.	110
Abbildung 36: Unterschiede in den Mustern löslicher Sekundärmetabolite der ZI4cl1 und Col-0.	112
Abbildung 37: Sekundärmetaboliten-Muster von UV-bestrahlten Col-0- und ZI4cl3-Keimlingen und ihrer unbehandelten Kontrollen.	115
Abbildung 38: HPLC-Profile methanolischer Extrakte löslicher Sekundärmetabolite verschiedener Col-0-, SL4cl3- und tt4(2YY6)-Organe.	118
Abbildung 39: UV-Spektren der Standards von Quercetin und Sinapat, zusammen abgebildet mit den UV-Spektren von Verbindungen, die in den Extrakten nachgewiesen wurden.	119
Abbildung 40: Quantifizierung der prominentesten Flavonoide in unterschiedlichen Geweben von At4CL3-Nullmutanten und Col-0 Wildtyp.	120
Abbildung 41: HPLC-Profile löslicher Sekundärmetabolite von Blattextrakten 6 Wochen alten At4CL1/At4CL2/AtF5H-Mehrfachmutanten.	122
Abbildung 42: Modell zur Entstehung und Evolution der At4CLs nach mehreren Duplikationsrunden. (Weitere Beschriftung befindet sich auf der folgenden Seite)	134
Tabelle 4: Herkunft der für die phylogenetischen Analysen verwendeten 4CLs.	159
Abbildung 43: Baumdarstellung der phylogenetischen Analyse eines reduzierten Satzes mit für jede Klasse repräsentativen 4CLs.	160
Abbildung 44: Ungewurzelte Baumdarstellung der phylogenetischen Analyse annotierter 4CLs und den nächsten 4CL-ähnlichen Verwandten in <i>A. thaliana</i> .	161
Tabelle 5: Mutmaßliche cis-aktive Elemente, identifiziert mit Hilfe der PLACE Datenbank.	162
Tabelle 6: Häufigkeit und Verteilung von W-Boxen in Promotoren von Phenylpropanstoff-Genen.	163

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der Arbeit

1.1.1 Sekundärmetabolite

Die erfolgreiche Behauptung von Pflanzen in der Evolution ist in ihrer Fähigkeit begründet, dynamisch auf die Herausforderungen der Umwelt zu reagieren. Diese Fähigkeit zur Anpassung beruht auf der Modulierung von Syntheseraten, differenzierter Einlagerung und präziser Steuerung des Umsatzes von sogenannten Sekundärmetaboliten. Der Terminus Sekundärmetabolit kann irreführend sein, denn in der Vergangenheit wurden diese Verbindungen fälschlicherweise als Abfallprodukte des primären Stoffwechsels betrachtet und ihnen wurde eine geringe oder gar keine Bedeutung innerhalb des Metabolismus und für die Entwicklung von Pflanzen zugemessen. Inzwischen ist es klar, dass die Sekundärmetabolite in Pflanzen wichtige Rollen in der Entwicklung spielen, Schutzfunktionen tragen und der Kommunikation dienen. Dies sind nur einige der bekannten Aspekte, viele weitere Funktionen werden in Zukunft noch aufgedeckt werden. Sekundärmetabolite unterscheiden sich klar von Produkten und Intermediaten des Primärstoffwechsels und sind extrem variant. Mehr als 15.000 verschiedene Sekundärmetabolite verschiedenster Substanzklassen wurden inzwischen identifiziert und teilweise funktionell charakterisiert. Es wird angenommen, dass dies nur einen Bruchteil von etwa 5-10% der Verbindungen darstellt, die tatsächlich in der Natur vorkommen (Wink, 1988). Viele Substanzklassen sind spezifisch wenige Familien von Pflanzen, manche wurden sogar bislang nur in einzelnen Spezies entdeckt.

Die biochemische Entwicklung der Pflanzen spiegelt deren Differenzierung im Laufe der Evolution wieder und ist ein Grund für die enorme Vielfalt pflanzlicher Sekundärmetabolite, wie sie im breiten Spektrum heutiger Landpflanzen zu finden ist.

1.1.2 Biochemische und molekulare Evolution

Spezies entwickeln sich im Laufe der Evolution nicht in Isolation, sondern in Interaktion mit der Umwelt und anderen Spezies (Swain, 1986). Die Differenzierung biochemischer Interaktionen spielt bei der Entwicklung von Landpflanzen eine entscheidende Rolle.

Daher verlief die biochemische Entwicklung der Pflanzen parallel mit der evolutionären Spezialisierung. Die enorme strukturelle Vielfalt der pflanzlichen Sekundärmetabolite liegt in der Notwendigkeit zahlreicher spezifischer Funktionen. Sekundärmetabolite regulieren Entwicklung, Wachstum, dienen dem Schutz vor UV-Strahlung, Herbivoren, Pathogenen und stellen wichtige Signalmoleküle dar. Es entwickelten sich hochvariante Gruppen von Metaboliten. Ein Beispiel der weit differenzierten Funktion stellen Sekundärmetabolite in ihrer Aufgabe der Verteidigung von Pflanzen dar. Pflanzen schützen sich effektiv gegen Herbivoren, Pilze, Bakterien

und weitere Pathogenen mit Hilfe verschiedenster Substanzklassen. Neben den präformierten Barrieren wird dies eindrucksvoll demonstriert durch die Entwicklung von cyanogenen Glukosiden, Glukosinolaten, Alkaloiden, phenolischen Verbindungen, Terpenen und Phytoalexinen. Eine provokante These in diesem Zusammenhang erklärt den Niedergang der Dinosaurier mit der Evolution der Alkaloide in frühen Blütenpflanzen der Kreidezeit, da heutige Reptilien ebenso nicht in der Lage sind, anhand des Geschmacks toxische Alkaloide zu erkennen (Swain, 1981).

Ein Beispiel der Evolution einer Klasse von Sekundärmetaboliten stellen die Flavonoide aus der Klasse phenolischer Verbindungen dar. Basierend auf den gut untersuchten biosynthetischen Stoffwechselwegen wird angenommen, dass sich die unterschiedlichen Flavonoid-Gruppen mit ansteigender struktureller Komplexität in einer Reihe von evolutionären Ereignissen nacheinander entwickelten (Swain, 1986). Die einfachsten Verbindungen wie Flavanone entstanden in den ersten Organismen, die in der Lage waren, Photosynthese durchzuführen, dagegen sind die komplexen Verbindungen wie Anthocyane ein Merkmal evolutionär jüngerer Taxa. Im Laufe dieser Entwicklung erforderte die Evolution früher vaskulärer Systeme in Pflanzen die Biosynthese von Lignin und damit die ersten Synthesen von Zimtsäurederivaten. Die nächste Stufe stellte das Erscheinen von Flavonolen in Farnen dar, Vorstufen der Fraßinhibitoren Proanthocyanidine oder Tannine. Eine letzte Schwelle wurde mit der Synthese farbiger Pigmente in Angiospermen erreicht, Anthocyanine, Chalcone und Aurone, die z.B. wichtige Rollen bei der Attraktion von Pollinatoren spielen (Cooper-Driver und Bhattacharya, 1998).

Mit dieser biochemischen Evolution geht die Entwicklung der Enzyme der Synthesewege einher. Ein frühes Modell (Horowitz, 1945) erklärt die Entstehung metabolischer Wege durch den schrittweisen Erwerb von Enzymen im Laufe der Evolution. Alternativ wird die Entstehung durch einen "Flickwerk-Mechanismus" (Jensen, 1976) diskutiert, nach dem Stoffwechselrouten ursprünglich durch primitive Enzyme mit breiter Substratspezifität zusammengesetzt wurden. Nach Gen-Duplikation divergieren die Enzyme und die Spezifität wird langsam erhöht. Ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren kann sich so entsprechend den Erfordernissen des Selektionsdrucks eine enorme Variation entwickeln. Die Funktion eines Enzyms ist somit Folge der Selektion während der Entwicklung und direkt gekoppelt an die Varianz der Sequenz. Das Resultat der Evolution ist die beobachtete Vielfalt an Stoffwechselwegen, mit deren Hilfe heutige Pflanzen Sekundärmetabolite einer enormen strukturellen Bandbreite erzeugen. Funktionen von Sekundärmetaboliten wurden aus unterschiedlichsten Motivationen in zahlreichen Pflanzen untersucht. Zur Untersuchung grundsätzlicher, im Pflanzenbereich weit verbreiteter Mechanismen der Synthesewege und der Funktionen ihrer synthetisierten Verbindungen eignen sich jedoch die meisten Pflanzen nicht wegen ihrer hohen Komplexität der Sekundärmetaboliten-Muster. Ein geeignetes Modellsystem bringt viele Vorzüge. Fokussierung wissenschaftlicher Anstrengungen auf einen Modellorganismus hat den Vorteil, dass die Resultate und Aufdeckung von Zusammenhängen leichter miteinander kombiniert werden können.

1.1.3 *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) als Modellsystem

A. thaliana wurde bereits 1907 in ersten biologischen Experimenten eingesetzt (Laibach, 1907), in denen gezeigt werden konnte, dass die Anzahl der Chromosomenpaare in *A. thaliana* im Vergleich zu anderen Pflanzen mit fünf vergleichsweise niedrig war. Eine ganze Reihe von Eigenschaften machten sie zu einer wichtigen Modellpflanze in der heutigen Wissenschaft. Diese sind ein kurzer Lebenszyklus der diploiden, selbstbefruchtenden Pflanze, die hohe Menge an Samen, der geringe Platzbedarf und die niedrigen Anforderungen für die Kultivierung, die natürliche große Varietät zahlreicher Ökotypen, die problemlose Generierung transgener Linien und die Verfügbarkeit mutagenisierter Populationen. Erneut war es Friedrich Laibach, der diese Vorzüge beschrieb (Laibach, 1943) und bereits sehr früh das Potenzial von *A. thaliana* als genetischem Modellorganismus erkannte. Eine der wichtigsten Tatsachen aber ist, dass *A. thaliana* das kleinste Kern-Genom blühender Pflanzen besitzt (Bennett *et al.*, 1976), das zudem annähernd vollständig sequenziert wurde (www.arabidopsis.org). Dennoch hat die Verwendung von Modellsystemen wie *A. thaliana* auch einen Nachteil, denn durch die Reduktion der biologischen Komplexität können keine Informationen über spezielle Differenzierungen gewonnen werden und nicht alle hier erhaltenen Einsichten müssen grundsätzlich vollständig auf andere Pflanzen übertragbar sein.

1.1.4 Klassen von Sekundärmetaboliten in *A. thaliana*

Gerade in Hinsicht auf die Analyse von Sekundärmetaboliten ist *A. thaliana* wertvoll, da die oben beschriebene Komplexität im Pflanzenreich in *A. thaliana* deutlich reduziert ist. Im Vergleich zu den über 15.000 bereits identifizierten Sekundärmetaboliten wurden für *A. thaliana* nur 36 beschrieben (Chapple, 1994). In der Zwischenzeit kamen zwar noch weitere Verbindungen hinzu (Hagemeier *et al.*, 2001; P. Bednarek, MPI für Züchtungsforschung, pers. Mitteilung). Es zeigte sich jedoch, dass in *A. thaliana* alle bekannten Sekundärmetabolite in vier Klassen gruppieren. Glukosinolate und weitere indolische Verbindungen stellen beide wichtige Sekundärmetaboliten zum Schutz der Pflanze vor Pathogenen (Fraßfeinde, Pilze und Mikroben) dar. Flavonoide sind wichtige Signalmoleküle und UV-Schutz-Verbindungen. Hydroxyzimtsäure-Verbindungen, Ligninvorstufen und Vorläufer phenolischer, Zellwand-gebundener Substanzen spielen nicht nur in der Entwicklung eine essentielle Rolle, sondern sind ebenfalls wichtig für den Schutz der Pflanze und die Abwehr von Pathogenen. Da die beiden letzten Klassen, die Flavonoide und Phenylpropane, einen Kernpunkt dieser Arbeit darstellen, wird auf besondere Erläuterung der Funktionen von Glukosinolaten und den weiteren indolischen Verbindungen an dieser Stelle verzichtet.

Die Aufgaben von Flavonoiden

Flavonoide sind Verbindungen, die sich aus mehreren aromatischen Phenylringen zusammensetzen, häufig verknüpft über Kohlenwasserstoffketten mit konjugierten Doppelbindungen oder über einen assoziierten Pyrrolring mit weiteren Keto- und Hydroxy-Funktionen. Ergebnis ist oft ein Cumarin-ähnliches Grundgerüst, das vielfach und komplex substituiert sein kann. Diese Struktur bedingt, dass Flavonoide Licht bis in den sichtbaren Bereich hinein absorbieren können. Mehr als 4000 Flavonoide wurden bereits aus vaskulären Pflanzen und Bryophyten isoliert (Harborne, 1988) und stellen häufig farbige Pigmente dar, die in Blüten genutzt werden, um Pollinatoren anzulocken, und die in anderen Geweben Schutzfunktionen ausüben, wie Schutz vor Herbivoren (Dixon *et al.*, 1983), als UV-Filter (Stafford, 1991) und als Anti-Oxidantien oder Radikalfänger (Rice-Evans *et al.*, 1997). Signalstofffunktionen wurden ebenfalls bereits beschrieben, z.B. Signale zur Induktion bakterieller Nodulatoine (Spencer und Towers, 1988) und weitere Schlüsselrollen in Pflanzen-Mikroben Interaktionen (Winkel-Shirley, 2001). Auch wurde für Flavonoid-Glukoside eine Rolle als Modulatoren der Zellteilung (Woo *et al.*, 1999) und als Regulatoren des Auxin Transports nachgewiesen (Jacobs und Rubery, 1988).

Die Aufgaben von Hydroxyzimtsäure-Derivaten

Der Term Hydroxyzimtsäure-Derivat erfasst eine Klasse von Verbindungen mit einem offenkettigen Phenylpropan-Grundgerüst, das verschiedenste Ring-Hydroxylierungen und -Methoxylierungen trägt. Diese Klasse ist ubiquitär in höheren Pflanzen vertreten (Bate-Smith, 1962), und es wurden bereits mehrere tausend Phenylpropan-Strukturen aufgeklärt. Bestimmte Verbindungsgruppen mit spezifischen Substitutionsmustern können aber auf einzelne Arten oder Spezies beschränkt sein. Lignin ist nach Zellulose das zweithäufigste Biopolymer der Erde (Boudet, 1998) und wird aus den drei Monolignolen 4-Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyl-Resten durch radikalische Polymerisierung unterschiedlicher Mengen an 4-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapoyl-Alkohol aufgebaut. Alle diese Vorstufen werden ausgehend von dem Grundmolekül 4-Cumarsäure synthetisiert. Die Bedeutung von Lignin liegt in dem Erhalt struktureller Stabilität und ist wahrscheinlich eines der wichtigen Merkmale, das (Land)-Pflanzen sich in der Evolution aneignen mussten, um den Übergang aus dem Wasser zu vollziehen. Lignin-Einlagerung findet nur in sehr limitierten Zelltypen statt, wie den Tracheen im Xylem und dem Sklerenchym, selbst dort ist sie nur in den sekundären Zellwänden zu finden. Durch die hydrophoben Eigenschaften ist Lignin ebenfalls wichtig für den Wassertransport, der über die Leitbündel abläuft. Daher ist die Regulation der Ligninbiosynthese auch von entscheidender Bedeutung für das Pflanzenwachstum und die Entwicklung (Lee *et al.*, 1998). Neben der Biosynthese von Lignin sind Hydroxyzimtsäure-Derivate Bestandteile unlöslicher Polymere wie Cutin oder Suberin (Riley und Kolattukudy, 1975) oder Polysacchariden in Zellwandfraktionen (Fry, 1986). Sowohl den konjugierten als auch freien Derivaten werden zahlreiche biologische Funktionen zugeschrieben. Weitere Funktionen der Phenylpropane bestehen in Phytoalexinen, Abwehr und Schutz-Verbindungen, Vernetzung und Stabilisierung der Zellwand

sowie Neusynthese von Zellwandmaterial bei Pathogen-Befall und dem UV-Schutz (Harborne, 1980).

1.1.5 Der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel

Die beiden Verbindungsklassen der Flavonoide und Zimtsäure-Derivate werden ausgehend von einem zentralen Pflanzenstoffwechsel synthetisiert, dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel, dessen Modell im Folgenden kurz beschrieben wird. Die Verbindung Phenylalanin, das über den Shikimat-Stoffwechsel eingespeist wird, wird in einer ersten Reaktion, katalysiert von der Phenylalanin-Ammonium Lyase (PAL), desaminiert, es entsteht Kaffeesäure. Diese wird im zweiten Schritt von einem membranverankerten P450-Enzym (Kaffeesäure-4-Hydroxylase, C4H) in para-Position zu 4-Cumarsäure hydroxyliert.

Die 4-Cumarsäure stellt in diesem Stoffwechsel nun ein wichtiges, zentrales Intermediat dar, da ausgehend von dieser Verbindung die zwei Unterstoffwechselwege zur Synthese von Flavonoiden und der Synthese von Ligninvorstufen und phenolischen Verbindungen abzweigen.

Die 4-Cumarat:CoA Ligasen in *A. thaliana* (*At4CLs*)

Das Enzym 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL; EC6.2.1.12) ist das letzte Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel-Kerns. Allgemein gesehen katalysiert das Enzym die Bildung von Coenzym A-Thioestern der 4-Cumarsäure und weiteren Hydroxy- und Methoxy-Derivaten der 4-Cumarsäure. Es gehört zur Klasse der Adenylat-bildenden Enzyme, die einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus besitzen. Der Bildung eines Adenylat-Substrat Intermediates in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} folgt die Veresterung mit Coenzym A, (CoA Ligasen), 4'-Phosphopanthein (Peptid Synthasen) oder die Oxydation durch molekularen Sauerstoff (Luziferasen) (Cukovic *et al.*, 2001).

Zu Beginn der Arbeit waren drei Enzyme bekannt, die in *A. thaliana* diese Reaktionen katalysieren können, *At4CL1*, *At4CL2* und *At4CL3*. Basierend auf Expressions-Untersuchungen und heterologer Expression der Enzyme in *E. coli* mit Charakterisierung der Enzymeigenschaften wurde ein Modell postuliert, nach dem die *At4CLs* an spezifischen Positionen des Phenylpropanstoffwechsels die Aktivierung der 4-Cumarsäure und ihrer bevorzugten Derivate katalysieren. Diese und die weiteren Informationen zu der Gruppierung der *At4CLs* im allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel und in den abzweigenden Ästen entstammen der Publikation Ehling *et al.* (1999).

Für *At4CL3* wurde eine Funktion am Eintrittspunkt des Flavonoid-Stoffwechsels postuliert, während *At4CL1* und *At4CL2* mit 4-Cumarsäure und ihren Derivaten Vorstufen der Ligninbiosynthese aktivieren. Da es sich hier um zentrale Schlüsselpositionen innerhalb des Stoffwechsels handelt, ist sowohl die Gewebespezifische als auch Stimulus-spezifische Regulation der Transkription von großer Bedeutung. Die Position von *At4CL3* wurde vorgeschlagen, nachdem mRNA Akkumulation nach UV-Perzeption sowie in Blütengewebe detektierbar war. Dies sind Bedingungen, unter denen die Flavonoid-Biosynthese wichtige Funktionen

innehat. Bereits früh konnte schon gezeigt werden, dass Flavonoid-Stoffwechselweg-Gene durch UV-Licht und pilzliche Elicitoren transkriptionell aktivierbar waren (Hahlbrock und Scheel, 1989). Da aber in *A. thaliana* keine Phytoalexine bekannt sind, die über den Flavonoid-Stoffwechselweg synthetisiert werden, ist auch kein Einfluss von Pathogenen oder einem pilzlichen Elicitor zu erwarten.

Die Akkumulations-Muster der mRNA von *At4CL1* und *At4CL2* setzen sich hiervon klar ab. Beide sind aktiv in ligninifizierendem Gewebe sowie durch Verwundung oder Pathogenbefall transkriptionell induziert. Daher wurde eine Aufgabe in der Synthese von Vorläufern der Ligninbiosynthese und weiterer Zellwand-gebundener Phenylpropane vorgeschlagen.

In der folgenden Abbildung 1 ist das Schema des metabolischen Netzwerks des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels dargestellt, dem die eben beschriebenen Daten zugrunde lagen.

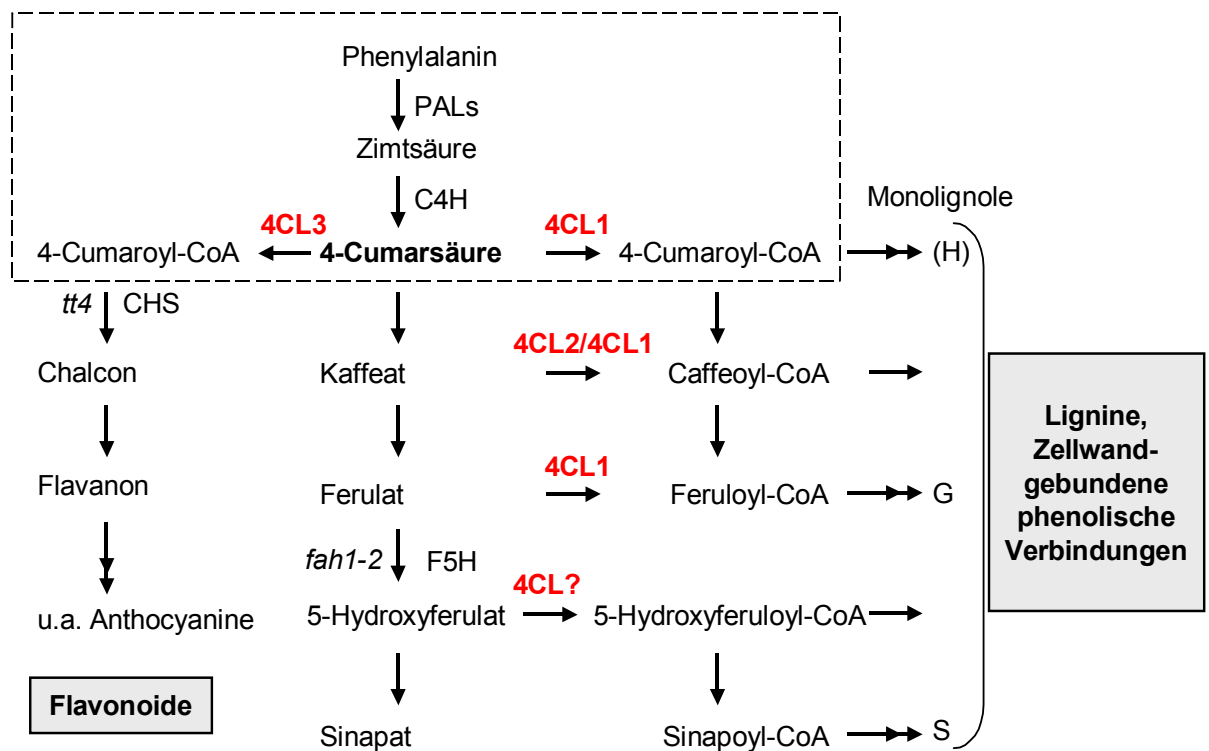


Abbildung 1: *At4CLs*, Pfortner im postulierten Netzwerk des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels.

Die mutmaßlichen Positionen der 4CLs, basierend auf *in vitro* Daten, sind in diesem Modell des *A. thaliana* Phenylpropanstoffwechsels sowie den angrenzenden Stoffwechselwegen zu den Flavonoiden und den Ligninen und Zellwand-gebundenen phenolischen Verbindungen dargestellt. Ebenso abgebildet sind die Positionen weiterer Einzelkopie-Gene, die bereits kloniert sind und deren Funktion schon aufgeklärt wurde. Mit einem gestrichelten Block umrandet ist der Kern des Phenylpropanstoffwechsels bis zu den Abzweigungen in die Unterstoffwechselwege.

Ausgehend von einem zentralen pflanzlichen Sekundärstoffwechsel katalysieren die At4CLs postulierte Schlüsselpunkte des Metabolitenflusses, der in zwei sehr unterschiedliche Unterstoffwechselwege abzweigt, weiter sind ihre Enzymeigenschaften bereits gut charakterisiert, und die einzelnen Mitglieder zeigen spezifische Substratpräferenzen. Umfangreiche *in vitro* Informationen untermauern das in Abbildung 1 dargestellte Modell des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels mit dieser im Kern liegenden Multigen-Familie. All dies macht die At4CLs zu hochinteressanten, vielversprechenden Enzymen, um mit der Aufklärung ihrer *in vivo* Funktionen weitere grundlegende Einsichten in zwei fast ubiquitäre pflanzliche Sekundärstoffwechselwege zu gewinnen.

Verständnis der Stoffwechselwege und der Funktionen ihrer Intermediate und Endprodukte sowie der Enzyme, die für deren Biosynthese verantwortlich sind, kann die gezielte Manipulation dieser Wege ermöglichen, um ökonomisch oder medizinisch wertvolle Sekundärmetaboliten zu erzeugen, die Resistenz der Pflanze gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren zu erhöhen, physikalische, anwendungsbezogene Eigenschaften zu ändern, die z.B. die Verarbeitung erleichtern oder weitere Möglichkeiten zu eröffnen.

1.1.6 Manipulation von Stoffwechselwegen

Biochemische Charakterisierung und weitere molekularbiologische und Expressions-Analysen sind der erste Schritt in der Aufklärung der Funktionen des von einem untersuchten Gen kodierten Proteins. Entscheidend aber für Einsichten in die Funktionsweise von Stoffwechselwegen sind die *in vivo* Funktionen der Enzyme, aus denen sich diese Wege zusammensetzen. Manipulation der Stoffwechselwege oder der Funktion individueller Enzyme kann auf mannigfaltige Weise geschehen.

Die vier Ebenen, auf denen solche Manipulationen stattfinden können, werden im Folgenden kurz umrissen, da die Wahl einer geeigneten Methode zur spezifischen Beeinflussung des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels in *A. thaliana* einen Kernpunkt dieser Arbeit darstellte und während der gesamten Zeit mögliche Alternativen zu der eingesetzten Methode betrachtet wurden.

Die älteste Strategie nutzt die natürliche Variation des Genoms verschiedener Kultivare oder Ökotypen (in *A. thaliana*). Vergleiche können hier zu der Isolierung natürlich vorkommender Mutanten führen. Ein prominentes Beispiel direkt aus *A. thaliana* stellt die Identifikation des *erecta*-Allels dar, einer Mutation mit starkem morphologischem Phänotyp, die durch Vergleiche der zwei Ökotypen Landsberg *erecta* und Columbia-0 identifiziert und charakterisiert wurde. Mehr als 50.000 Polymorphismen oder Einzelnukleotid-Austausche sind inzwischen bekannt.

Eine Methode, die sich auf endogene Mechanismen der DNA-Reparatur und natürliche, während der Zellteilung vorkommende Ereignisse stützt, ist die homologe Rekombination, mit deren Hilfe gezielt durch Einbringen manipulierter DNA homologe Bereiche im Genom ausgetauscht werden können. Das Ergebnis ist ein Bereich mit veränderter Funktionalität. Obwohl diese Strategie in vielen

Modellorganismen (Maus und Drosophila) weit fortgeschritten ist und erfolgreich praktiziert wird, konnte bislang in nur einer niederen Pflanze (*Physcomitrella patens*) der Erfolg dieses Systems gezeigt werden. In *A. thaliana* liegt die Effizienz mit 0.1 bis 1 Promille deutlich unter dem Schwellenwert für praktische Anwendungen.

Die direkte, ungerichtete Veränderung des Erbguts wurde mit *A. thaliana*-Samen unter Einsatz verschiedenster mutagenener Methoden bereits sehr früh durchgeführt. Als Beispiel physikalischer Mutagenisierung sei hier als Erstes die Röntgenstrahlung genannt, mit der schon 1947 erfolgreich Mutationen in *A. thaliana* induziert wurden (Erna Reinholz, Primärliteratur nicht vorliegend, zitiert in: Meyerowitz *et al.*, 2001). Die Chemikalie Ethylmethansulfonat (EMS) wird heute breit zur Erzeugung chemisch induzierter, ungerichteter Mutationen eingesetzt. Einzelnukleotid-Austausche sind hier die Basis für subtilere Mutanten mit veränderter Expression oder Funktion, Nullmutationen sind daher nicht die Regel. Transposons, Gene, die in der Lage sind, ihre Position im Genom autonom zu verändern, wurden in Mais bereits sehr früh beschrieben (McClintock, 1951). Kodiert der Bereich, in dem nach der Transposition ein solches Element landet, für ein Gen, so ist dieses mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Insertion inaktiviert. Das erneute Herausspringen des Transposons kann unter Umständen einen sogenannten *footprint* oder einzelne Nukleotid-Austausche an der Stelle hinterlassen, an der es sich zuvor befand, diese können ebenfalls die Aktivität des betreffenden Gens oder des davon kodierten Proteins verändern. Da in *A. thaliana* bislang keine endogenen Transposons entdeckt wurden, bestand ein Ansatz darin, Elemente aus Mais, wie das En-1 autonome Transposon, in *A. thaliana* zur Mutagenisierung zu nutzen (Wismann *et al.*, 1998).

Einen indirekten, aber gerichteten Ansatz zur Erzeugung von Mutanten stellen posttranskriptionelle Methoden der Manipulation auf der Ebene der mRNA dar. Hierbei wird eine Duplexbildung bereits transkribierter mRNA mit artifizieller, komplementärer gegenläufiger RNA genutzt ("antisense"-Suppression). Die Duplex-RNA kann an den Ribosomen nicht in Protein übersetzt werden, Ergebnis ist je nach Effizienz der Expression der komplementären RNA eine mehr oder weniger starke Unterdrückung der Proteinsynthese. Ein strategisch ähnlicher Ansatz, dessen Funktionsweise noch nicht vollständig aufgeklärt ist, stellt RNAi (RNA-*interference*) dar, wobei eine im Vergleich zu der "antisense"-Suppression höhere, aber immer noch nicht vollständige Unterdrückung der Proteinsynthese erreicht wird (Waterhouse *et al.*, 1998). Diese Methode ist daher nicht zur sicheren Generierung von Nullmutanten geeignet und birgt im Gegenzug das potentielle Risiko, alle sequenzähnlichen Gene zu beeinflussen (P. Waterhouse, pers. Mitteilung).

Der Vollständigkeit halber werden im Folgenden kurz weitere Methoden der Manipulation der Enzymaktivität beschrieben, die jedoch keinen direkten Einfluss auf den praktischen Teil dieser Arbeit hatten.

Auf der Ebene bereits translatisierter, enzymatisch aktiver Proteine wurde im Zusammenhang mit dem Phenylpropanstoffwechsel der Einsatz synthetischer, nicht-physiologischer Analoga der Substrate Phenylalanin, Zimtsäure und 4-Cumarat beschrieben. Unter geeigneten Bedingungen konnte eine kompetitive Hemmung der *in vivo*-Aktivität von PAL durch α -Aminoxy- β -Phenylpropionsäure (AOPP, Amrhein und Gödeke, 1977), Piperonylsäure-Hemmung der *in vivo* Aktivität von Tabak C4H (PA, Schalk *et al.*, 1998) und der *in vivo* 4CL-Aktivität durch Methylenedioxy-

Zimtsäure (MDCA, Funk und Brodelius, 1990) beschrieben werden. Augenscheinliche Nachteile dieser Methode sind jedoch zu erwartende Nebeneffekte unter den unphysiologischen Bedingungen, die Unspezifität gegenüber Isoformen und eine unvollständige Unterdrückung der Aktivität.

Die letzte Ebene der Manipulation von Stoffwechselwegen findet letztendlich auf der Stufe der Substrate oder Produkte statt. Dies kann erreicht werden durch heterologe Expression von Enzymen, die entweder mit den zu untersuchenden Enzymen um Vorstufen konkurrieren oder die Produkte einer enzymatischen Reaktion derivatisieren, sodass sie für weitere Umsetzungen innerhalb des Stoffwechsels nicht zur Verfügung stehen. Ein weithin bekanntes Beispiel hierfür ist die NahG-Mutante, in der durch eine bakterielle Hydroxylase die Salicylsäure in *A. thaliana* nach ihrer Synthese in eine inaktive Form konvertiert wird (Lawton *et al.*, 1995). Auf der Ebene der CoA-Ester der Phenylpropane war die Erzeugung von transgenen *A. thaliana*-Linien, die eine heterologe CoA-Esterase exprimieren, nicht erfolgversprechend, da dies nur eine Konkurrenzreaktion zu den CoA-Ligasen darstellen würde und ebenso unphysiologische Effekte zeigen könnte. Erst kürzlich wurde eine elegantere Alternative hierzu beschrieben, die sich einer bakteriellen 4-Cumarat-CoA Hydratase/Lyase Homologen bedient (HCHL, Mitra *et al.*, 1999), die *in vivo* in Tabak 4-Cumarat:CoA, Kaffeeat:CoA und Ferulat:CoA in die entsprechenden Hydroxy-Benzaldehyde umwandelt (Mayer *et al.*, 2001).

1.1.7 Mutanten des Phenylpropanstoffwechsels

Aus mehreren Gründen sind die Stoffwechselwege der Lignin-Vorstufen und Phenylpropane sowie der der Flavonoide klassische Gebiete der Sekundärmetaboliten-Forschung. Zum Ersten können diese Stoffwechselwege in Pflanzen manipuliert werden, da zumindest unter kontrollierten Laborbedingungen viele der Produkte dieser Stoffwechselwege nicht essentiell für das Überleben der individuellen Mutanten sind. Die Tatsache, dass die meisten Sekundärmetabolite entweder UV-Licht absorbieren, farbig oder fluoreszent sind, macht sie zu idealen endogenen Reportern der metabolischen Stoffwechselwege und der regulatorischen Elemente, die sie kontrollieren, speziell gilt dies für die Flavonoide (Chapple *et al.*, 1994). Hier demonstriert die Verwendung einer Modellpflanze wie *A. thaliana* erneut, wie wirkungsvoll klassische biologische Untersuchungen, kombiniert mit molekularen und biochemischen Analysen, sind. Zahlreiche Mutanten in *A. thaliana* wurden bereits über die Identifizierung leicht zu erkennender Phänotypen isoliert. Auf der Interpretation der beobachteten Veränderungen gegenüber Wildtyp-Pflanzen basiert heute ein beträchtlicher Teil des Wissens über die metabolischen Stoffwechselwege der Sekundärmetabolite. Zwei der klassischen und für heutige Untersuchungen wegweisende Beispiele von *A. thaliana*-Mutanten, die über diesen sogenannten *forward* Ansatz isoliert wurden - von der Analyse des Phänotyps wurden Funktionen der betroffenen Gene *in vivo* abgeleitet - werden im nächsten Abschnitt beschrieben, da diese Mutanten auch im weiteren Kontext der Analysen dieser Arbeit wichtig waren.

Die *A. thaliana* Ferulat-5-Hydroxylyase (AtF5H) und die fah1-2 Mutante

Basierend auf visuellen Durchsichtungen von Mutantenpopulationen wurde eine Reihe von Mutanten isoliert, die Defekte in der Sinapoylmalat-Biosynthese aufwiesen (Chapple *et al.*, 1996). Das AtF5H Gen wurde nach Isolierung einer T-DNA-mutagenisierten Linie kloniert und identifiziert. Das Enzym ist eine von drei (mit C4H und C3H) auch für die Ligninbiosynthese essentiellen Cytochrom-P450-Monooxygenasen in Angiospermen. Als Einzelkopie-Gen katalysiert AtF5H die Umsetzung von Ferulasäure zu 5-Hydroxyferulasäure, einer möglichen Vorstufe des Syringin-Ligninmonomers und der Sinapat-Derivate.

Die Linie fah1-2 wurde über EMS-Mutagenisierung im Col-0-Hintergrund erzeugt, sie zeigt den stärksten Phänotyp der Serie und vollständiges Fehlen von AtF5H-Transkript (Meyer *et al.*, 1996).

In Kombination mit At4CL-Mutanten wurde die fah1-2-Linie mit in die Analysen dieser Arbeit einbezogen, da die AtF5H in *A. thaliana* das zu diesem Zeitpunkt einzige bekannte Einzelkopie-Gen des Phenylpropanstoffwechselwegs war, über den die Ligninvorstufen synthetisiert werden. Zudem ist die Position der AtF5H innerhalb des postulierten metabolischen Netzes unabhängig von At4CLs und führt mutmaßlich zu den einzig bekannten At4CL-unabhängigen C6-C3 Verbindungen, den Sinapat-Derivaten. Einen Effekt dieser Mutation stellt eine höhere UV-Durchlässigkeit der Blätter dar, damit auch vermutlich eine höhere UV-Suszeptibilität (Chapple *et al.*, 1992).

Eine weitere Nullmutante dieses Stoffwechsels, die des Einzelkopie-Gens AtC3H, wurde erst 2002 parallel zu der Identifizierung des Gens isoliert (Franke *et al.*, 2002).

Die *A. thaliana* Chalcon-Synthase (AtCHS) und die tt4-Mutante

Die ersten *A. thaliana* Mutanten der Flavonoid-Biosynthese wurden bereits Anfang der siebziger Jahre über ihren leicht zu erkennenden Phänotyp der gelben Samen isoliert (Bürger, 1971). In den weiteren Jahren wurden zahlreiche weitere dieser tt-Mutanten (*transparent testa*) isoliert und charakterisiert (Koorneef, 1990). Es stellte sich heraus, dass der Phänotyp durch fehlende oder reduzierte Flavonoide in der *testa* (Samenschale) verursacht wurde und dass die gelbe Farbe auf die durch die *testa* sichtbaren Kotyledonen zurückzuführen war. Das erste Flavonoid-Gen, das aus *A. thaliana* kloniert wurde, war das Gen der Chalcon-Synthase AtCHS, ein Einzelkopie-Gen am Kopf des Flavonoid-Stoffwechsels (Feinbaum und Ausubel, 1988). Zwei Jahre darauf wurde nachgewiesen, dass das EMS-generierte, phänotypisch stärkste Allel ohne nachweisbare Flavonoide tt4 die zugehörige Mutante darstellte. Ein Effekt, der auf die Mutation und die fehlenden Flavonoide zurückgeführt wird, ist Hypersensitivität gegenüber UV-Licht (Li *et al.*, 1993).

1.1.8 Problemstellung der Arbeit

Wie oben beschrieben, stellen Mutanten eines der wertvollsten Werkzeuge zur Ableitung der *in vivo* Funktionen der von dem mutierten Gen kodierten Proteine dar. Ein großer Teil der Mutanten, die mit dem Phenylpropanstoffwechsel assoziiert sind, wurde anhand ihres Phänotyps isoliert und im Anschluss daran wurde häufig das

zugehörige Gen kloniert. Zweifellos hat dieser klassische Ansatz den Vorteil, dass die Mutation und der Phänotyp direkt miteinander in Verbindung zu bringen sind. Ein entscheidender Nachteil jedoch besteht in der Beschränkung auf Gene, die eine nicht-redundante Funktion erfüllen. Werden Stoffwechselwege tiefergehend charakterisiert, so stellt sich heraus, dass die einfach zugänglichen, phänotypisch auffälligen Mutanten oftmals Einzelkopie-Gene darstellen, deren Funktionen für die jeweiligen Stoffwechselwege essentiell sind. Die Wahrscheinlichkeit, mit diesem Ansatz Mutationen in Genen zu finden, die zwar eine wichtige Rolle in dem Stoffwechselweg ausüben, jedoch in Form von mehreren Allelen oder funktionell redundanten Isoformen vorliegen, ist äußerst gering. Der Zugang zu Mutanten dieser Gene eröffnet sich über einen zu der oben beschriebenen Strategie umgekehrten Ansatz, der heute ermöglicht wird durch die große Menge an verfügbaren Sequenzdaten.

Über den sogenannten reversen Ansatz werden, ausgehend von der genomischen Sequenz, die Mutanten der entsprechenden Gene isoliert, die dann im Anschluss phänotypisch charakterisiert werden, um die Funktion der jeweiligen, von den Genen kodierten Proteine abzuleiten. Es stellte sich aber heraus, dass die große Mehrzahl der inzwischen mehreren tausend über diesen Ansatz isolierten *A. thaliana* Nullmutanten keinen sichtbaren, direkt zugänglichen Phänotyp zeigen. Ein Grund hierfür ist sicherlich in der Genhäufigkeit zu finden. *A. thaliana*, *D. melanogaster* und *C. elegans* besitzen eine ähnliche Anzahl an Gentypen und durch mehr als eine Runde an Duplikationen sind Multi-Genfamilien sehr häufig (Bouché und Bouchez, 2001). 70 % der *A. thaliana* Gene sind in mehr als einer Kopie vertreten (Die *A. thaliana* Genom Initiative; Martinssen, 2000).

Das Phänomen eines schwierig zugänglichen Phänotyps ist gerade in Pflanzen durchaus erklärbar, da sie als sessile Organismen während der Evolution viele adaptive Züge entwickelt haben, um auf Änderungen ihrer biotischen und abiotischen Umwelt reagieren zu können. Daher ist zu erwarten, dass viele der Mutationen ihren Phänotyp erst unter bestimmten Bedingungen offenbaren (Thornycroft *et al.*, 2001). Analysen decken idealerweise mit einem integrierten Ansatz die Molekularbiologie, Biochemie und letztlich auch die Genetik ab, da hier mit der Kombination mehrerer Mutanten einer Multigen-Familie eine funktionelle Redundanz überwunden werden kann.

Dies setzt selbstverständlich voraus, dass die Mitglieder der betrachteten Familie vollständig in allen Analysen vertreten sind.

Die über Datenbanken verfügbaren genomischen Informationen von *A. thaliana* sind hierfür eine wertvolle Quelle, die nicht nur helfen kann, Multigen-Familien zu vervollständigen, sondern auch einen Ansatz zu der Vorhersage der Funktion eines gegebenen Gens aufgrund von Sequenzähnlichkeiten eröffnet. Phylogenetische Analysen stellen in der weiteren Untersuchung ein wertvolles Werkzeug aus evolutionärer Perspektive zur Verbesserung funktioneller Vorhersagen dar, die zuvor aufgrund von Ähnlichkeiten der Sequenzen getroffen wurden. Die *in vivo* Funktion eines Enzyms, das zu einer Gruppe homologer, bereits charakterisierter Enzyme gehört, kann leichter vorhergesagt werden. Ebenso lassen sich mit Hilfe der Phylogenie homologe Gene differenzieren in Orthologe, Gene unterschiedlicher Spezies, entwickelt von einem gemeinsamen Vorgänger, aber mit erhaltener

Funktion, und Paraloge, Gene dupliziert innerhalb eines Genoms, die von der ursprünglichen Funktion ausgehend neue Eigenschaften entwickeln können.

1.2 Ziele der Arbeit

Langfristiges und übergeordnetes Ziel dieses Projektes war die Aufschlüsselung der *in vivo* Funktionen der 4-Cumarat:CoA Ligase-Familie von Isoenzymen eines zentralen pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel, im Modellsystem *A. thaliana*.

Eine wichtige Voraussetzung dieser Untersuchung war die Vollständigkeit der Multigen-Familie. Daher bestand ein Teilaspekt des Projektes in der Nutzung der vorhandenen genomischen Ressourcen, um entweder den Beweis zu erbringen, dass die bis dahin bekannten drei Isoformen in *A. thaliana* alle Enzyme darstellen, die die spezifische Reaktion katalysieren, oder aber die Familie mit Isolierung der letzten Mitglieder aus dem *A. thaliana*-Genom zu vervollständigen.

Parallel zu den genomischen Informationen, die ständig erweitert wurden, wurden im Zeitrahmen dieser Arbeit von mehreren Gruppen unabhängiger Populationen transgener *A. thaliana*-Linien, die die Isolierung von Nullmutanten erlauben, verbessert, erweitert und neu aufgebaut. Um für alle *At4CL*-Gene funktionelle Nullmutanten zu isolieren, sind die zugänglichen Populationen von großem Nutzen.

Die Identifikation und der Nachweis möglicher subtiler Phänotypen von Einzelnullmutanten einer Multigen-Familie kann sich schwierig gestalten. Daher wurde ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Erzeugung multipler Nullmutanten gelegt, um mögliche funktionelle Redundanzen zu überwinden.

Letztlich ist die Analyse einer Familie von Isoformen an wichtigen Positionen eines Stoffwechsels nicht isoliert, sondern nur im Kontext weiterer Enzyme aussagekräftig. Daher wurden zwei weitere bereits charakterisierte Nullmutanten ebenfalls mit dem Ziel in die Untersuchung aufgenommen, innerhalb des Stoffwechsels möglichst viele strategische Punkte des Metabolitenflusses abzudecken und die Interpretation der *in vivo* Funktionen der 4-Cumarat:CoA Ligase-Familie in *A. thaliana* zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Alle Laborchemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad verwendet. Sie wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biorad (München), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von den Firmen Riedel-de Haen (Hannover) und Merck (Darmstadt). Die Substrate IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) und X-GLUC (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure) wurden von der Firma Biomol (Hamburg) verwendet. Chemikalien für die Herstellung von Kulturmedien lieferten die Firmen Difco Lab (Detroit, USA), GibcoBRL (Paesley, GB) und Sigma (Deisenhofen). Das Herbizid Glufosinat (BASTA) zur Selektion transgener Linien wurde von AgrEvo (Hoechst und Schering) bezogen.

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, DNA-Polymerasen, DNaseI, RNase, Mazerase, Lysozym und Zellulase sowie DNA-, RNA- und Protein-Größenmarker lieferten die Firmen Amersham (Buckinghamshire, UK), Roche (Mannheim), GibcoBRL (Paesley, GB), New England Biolabs (New England, USA) und Serva (Heidelberg). Hersteller des eingesetzten Radioisotops $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol) war die Firma Amersham (Buckinghamshire, UK). Das für die Reinigung radioaktiv markierter Sonden verwendete Säulenmaterial Sephadex G-25 superfine wurde von Pharmacia (Freiburg) bezogen. Röntgenfilme lieferte die Firma Kodak (Rochester, NY, USA).

2.2 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen mit hoch entionisiertem Millipore-Wasser angesetzt. Die meisten Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert.

2.3 Desoxyoligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen und sind in 5'-3' Richtung angegeben:

At4CL1 , genomische Matrize	
atggcgccacaagaacaagcagtttctca	4c11.1
gacaaccgagggcatagaagtcatcgact	4c11.2
ggccaacacaatcggcgggaacct	4c11.3
cattgaaatcatctttgctttttggttgaatcatc	4c11.4
aatacaaaatctcaccgggttga	4c11.5
Durchsichtung GARLIC-Population	

pET-30 NdeI XhoI Klonierung	
ccacacatatgggtgctccaacaacaaacgc	4c1lk A ndei
tcttgctcgagtttagagcacatggtttccaa	4c1lk B xhoi
RT-PCR	
gtttcctaatgccatttttggtcaggg	4CL4 1 RTPCR do
cagctacttcaccttcattgcaac	4CL4 2 RTPCR up
cgaggatcatcagctcatgaaagggttat	4CL4 3 RTPCR do
cgcttgtagtgaaccacctgtttgtttac	4CL4 4 RTPCR up
AtF5H	
gttcaagtacatgattaatttg	f5h1
catgggcttcagttcgtgatg	f5h2
gagtggatgaatagtgaagtagc	f5h3 up
gaaagagtggactagtgtgg	f5h4
gctaccgtttccgttcctccaaac	f5h5 up
gtagaagttctcatccaagatcg	f5h6 up
W-Boxen	
ttgttttgcaatagtcaaaactatacatcc	4WB1
ggatgtatagttttgactattgcaaaacaa	4WB2
cagcaaatattattgaccaagaaatgcaaa	4WB3
tttgcatttcttgggtcaataatatttgctg	4WB4
agaatttttgagggtcaactgcggaatgta	4WB5
tacattccgcagttgacctccaaaaattct	4WB6
avrRPM1	
gaattcggcaaaaatcgtagcgagggc	5' avrRPM1
aagccatagctaaagctgatattctatg	3' avrRPM1
AvrRpm1, zur Amplifikation der gesamten CDS	
atgggctgtgtatcgagcacttc	5' AvrRpm1-CDS
taactcgcctgcacggcttgtgg	3' AvrRpm1-CDS
avrPTO	
gtcgacggatctgaacctggtgg	5' avrPTO
tctagagacacatcttataattaac	3' avrPTO
En-1 und dSpm Transposon	
ggttggcagaaacattttgcttacg	603
tcaggctcacatcatgctagtcc	7631
cactacaagaaaamrkswaaggag	1/8287
cgggatccgacactctttaattaactgacactc	dSpm5
ggtgcagcaaaacccacacttttacttc	dSpm11
cttatttcagtaagagtgtggggttttg	dSpm1
gttttgccgacactccttacc	dSpm8
agaagcacgacggctgtagaatagga	en-205
gagcgtcgggtccccacacttctatac	en-8130
cgacactcttaatcgaagtaaaagtgtggg	alt5-inw
ggtaaggagtgtcggccaaaaacccac	3-inw
pQE, zum Sequenzieren nach ADIS	
cccgaaaagtgccacctgacg	QEpr Qiagen
gttctgaggtcattactggatc	QEre Qiagen

gaggtccaggaggaaaaaggc	QE2 Qiagen
gagcggataacaatttcacac	QE34 Qiagen
TMRI T-DNA , GARLIC Population, pDAP101 Plasmid rechte und linke Grenze	
gccttttcagaaatggataaatagccttgcttcc	LB1
gcttcctattatatcttcccaaattaccaataca	LB2
tagcatctgaatttcataaccaatctcgatacac	LB3
attaggcaccocaggctttacactttatg	RB1
gtatgtgtgtggaattgtgagcggataac	RB2
taacaatttcacacaggaacagctatgac	RB3
caaactaggataaattatcgcgcgcggtgtca	QRB1
ggtgtcatctatggttagatcgggaattga	QRB2
cgccatggcatatgctagcatgcataattc	QRB3
cgtcgcgaatgtgttattaagttg	nested_GARLIC LB
cattcggcggttaattcgtacat	primary_GARLIC LB
Signal , J.Eckers SALK Population, pROK2 Plasmid, linke Grenze	
tggttcacgtagtgggcatcg	SALK_LBa1
gcgtggaccgcttgctgcaact	SALK_LBb1
AtActin3	
gcgacaatggaactggaat	act_for
ggatagcatgtggaagtgcatacc	act_rev
Oligo(dT) Reverse Transkription	
ttttttttttttttttttttttttv	(T ₂₂ V)

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

E.coli-Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> λ (DE3)	Firma Stratagene
XL-1 blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> q Z.M15 Tn10 (Tetr)]	Firma Stratagene
SURE	<i>e14⁻</i> (<i>mcr</i>), Δ (<i>mcrCB</i> - <i>hsd</i> -SMR- <i>mn</i>)171, <i>endA1</i> <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>sbcC</i> <i>umuC</i> ::Tn5(<i>kan^r</i>), <i>uvrC</i> , {F' <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , Z Δ (M15Tn10, <i>Tet^R</i>)}	Firma Stratagene
OneShot	F ⁻ , ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>tonA</i>	Firma Invitrogen
Agrobacterium-Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
GV3101	mit pMP90-virulenz Plasmid, C59C1, Rif ^R	(Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)
Phagemid	wesentliche Merkmale	Referenz
pBluescript SKII (+/-)	<i>f1ori</i> , <i>colE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^R	(Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992)
Plasmide	wesentliche Merkmale	Referenz
pQE-70	T5-Promotor, 2x <i>LacOp</i> , RBSII, MCS, 6xHis-Tag, T ₀ , amp R	Firma QIAGEN
pET-30	T7/ <i>lac</i> -Promoter, 6xHis-Tag, S-Tag, MCS, kan R	Firma Novagen
pDRIVE U/A PCR cloning	<i>f1ori</i> , <i>colE1ori</i> , P _{<i>lac</i>} / <i>lacZ</i> , MCS, amp R, kan R, linearisiert mit U/A Überhängen	Firma QIAGEN
pTOPO 2.1 PCR cloning		

2.5 *A. thaliana*-Zellsuspensionskultur

Die Kultivierung der *A. thaliana*-Zellsuspension (Ökotyp Col-0, Linie At7) erfolgte wie beschrieben (Trezza *et al.*, 1993) unter Verwendung von modifiziertem B5- (Kombrink and Hahlbrock, 1986) und MS-Medium (Sigma, Deisenhofen). Fünf Tage nach Subkultivierung wurden die Zellen mit Elizitor behandelt oder protoplastiert.

2.6 Pflanzen und Pflanzenanzucht

2.6.1 Kultivierung von *A. thaliana*

Alle analytischen Arbeiten wurden mit dem *A. thaliana* Ökotyp Col-0 durchgeführt. Die Anzucht einzelner Mutantenlinien zur Propagation erfolgte nach folgendem Protokoll: Samen wurden auf ½ MS-Salz, 0,8 % Agar, 1xVitamin-Mix, ohne Saccharose über Nacht bei 4° C inkubiert und dann unter Langtagbedingungen (18 h Licht, 6 h Dunkelheit, 20 °C) in einem Lichtschrank (Kühllichtbrutschrank KBK/LS 4300, Firma BioTron, Hilden) angezogen. Nach 10 - 14 Tagen wurden die Keimlinge in Erde pikiert und nach einer Übergangsphase von 2 Tagen unter einer transparenten Schutzhaube in einer Phytokammer unter standardisierten Bedingungen (Langtag, UV-haltiges kaltes Weißlicht, 60% rel. Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) kultiviert. Die Samenbildung setzte nach etwa 8-10 Wochen ein, die Samenreife war nach etwa 12 Wochen vollständig abgeschlossen. Die trockenen Schoten wurden geerntet, die reifen Samen abgetrennt und unter Vakuum bei RT getrocknet. Alle Samen wurden bei 4°C gelagert.

Die Standardanzucht für Selbstungen, Kreuzungen und weitere Analysen wurden nach folgendem Protokoll für hohen Durchsatz durchgeführt:

Getrocknete reife Samen wurden auf feuchtem Filterpapier bei 4°C für 4 Tage einer Stratifikation unterworfen, um synchrone Keimung mit einer hohen Keimrate zu gewährleisten. Die gequollenen Samen wurden anschließend einzeln auf Schalen mit 6x9 Feldern übertragen und mit einer Übergangsphase unter einer transparenten Schutzhaube (7-10 Tage) in einer Phytokammer unter standardisierten Bedingungen (Langtag, UV-haltiges kaltes Weißlicht, 60% rel. Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angezogen.

Für die Anzucht und BASTA-Behandlung der 50 Linien umfassenden Pools der SLAT Population wurden jeweils ca. 300-500 Samen je Pool nach der Stratifikation einzeln in einem Raster auf große Schalen Erde übertragen. Nach der Keimung unter einer transparenten Schutzhaube (Phytokammer unter standardisierten Bedingungen, UV-haltiges kaltes Weißlicht, 60% rel. Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) wurden die Keimlinge für 5-8 Tage angezogen, bis Primärblätter aller Keimlinge entwickelt waren. Die Behandlung mit dem Herbizid BASTA erfolgte nach Protokoll (Tissier, *et al.* 1999), erfolgreiche Selektion wurde anhand parallel behandelten Col-0 Wildtyppflanzen kontrolliert. Nach zwei Tagen wurden die resistenten Keimlinge auf Schalen mit 6x9 Feldern übertragen und mit einer Übergangsphase unter einer transparenten Schutzhaube (7-10 Tage) in einer

Phytokammer unter standardisierten Bedingungen (Langtag, UV-haltiges kaltes Weißlicht, 60% rel. Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angezogen.

Geerntet wurden nur gesunde Blätter, Sprossachsen, Blüten oder Schoten, die sofort nach dem Abschneiden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Wurzeln von in Erde angezogenen Pflanzen wurden durch vorsichtiges Waschen von der Erde befreit und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.6.2 Sterile Flüssigkulturen

Die Anzucht steriler *A. thaliana*-Flüssigkulturen erfolgte unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) in 250 ml-Erlenmeyerkolben. Für die Gewinnung von Wurzelmaterial wurden 35 Oberflächen-sterilisierte Samen vier bis fünf Wochen in 40 ml flüssigem Medium (1 x MS-Medium, 3 % Saccharose, 0,1 g/l Myo-Inositol, 0,5 g/l MES, pH5,7) unter stetigem Schütteln kultiviert.

2.6.3 Herbizidselektion transgener Linien mit Bar-Resistenzgen

Pflanzenlinien zur Selektion wurden standardisiert auf Erde in einer Phytokammer (Langtag, UV-haltiges kaltes Weißlicht, 60% rel. Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angezogen. 8-12 Tage nach der Keimung, wenn bei allen Linien die Primärblätter sichtbar wurden, konnten die Pflanzen mit dem Herbizid BASTA behandelt werden. Hierbei war es wichtig, dass die Pflanzen durch reproduzierbare Bedingungen optimales Wachstum zeigten. 1.366 ml der BASTA-Lösung (Glufosinat, 183g/l) wurden in 1 Liter destilliertem Wasser mit 0.1% TWEEN gelöst. Selektion erfolgte durch Sprühen der Lösung. Zur Kontrolle wurden Col-0 Wildtyppflanzen parallel behandelt. Innerhalb von 24 h konnte die Selektion beobachtet werden, positive Linien wurden nach 3 Tagen auf frische Erde pikiert.

2.6.4 *A. thaliana* Phenylpropanstoffwechsel-Mutanten: Identifikation und Isolierung

Herkunft der verwendeten Linien: Durchsichtung mutagenisierter *A. thaliana* Populationen

Folgende Populationen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchsichtet:

Transposon-Populationen

Die *A. thaliana* Pflanzen der ZIGIA Population tragen das transponierbare Mais-Element En/Spm in seiner aktiven Form En-1 (Cardon *et al.*, 1993, EMBL accession number M 25427) im genetischen Hintergrund Col-0. Etwa 11.000 Einzelsamen-Nachkommen mit einer Anzahl von 6-25 Insertionen decken das *A. thaliana* Genom mit annäherungsweise 25.000 Genen zu etwa 50% ab.

Die Durchsichtung der Population erfolgte mit zwei Methoden. Zu Beginn dieser Arbeit wurden speziell generierte genspezifische Oligonukleotide in PCRs eingesetzt um in Pools von genomischer DNA in Kombination mit transposonspezifischen Oligonukleotiden Insertionen zu detektieren. Eine weitere Runde mit reduzierten Sätzen genomischer DNA gestattete im Anschluss an erfolgreiche erste Reaktionen

die Eingrenzung der Pools. Ergebnis waren Nachkommen von Pflanzen, deren Koordinaten sich aus den Reihen- oder Spaltensignalen ergaben. In diesem Fall wurden die Nachkommen der Reihen- und Spaltenpools ausgesät und in der nächsten Generation analysiert. Die Durchführung der PCRs auf den genomischen Pools und die Detektion möglicher Signale wurde von ZIGIA übernommen. Spezifische Oligonukleotide der Gene *At4CL2*, *At4CL3* und *AtC4H* wurden für die Analyse erzeugt und geprüft.

Mit dem identischen Ansatz war es zuvor Jens Hagemeyer gelungen eine *At4CL1* Insertions-Mutante zu identifizieren. In der isolierten Folgegeneration dieser Linie war bereits eine der zuvor homozygoten Transposoninsertionen verloren gegangen. Unpräzises Ausschneiden bei der Transposition des Elements führte zu einem *footprint*, einer stabilen Mutation die durch eine Leserahmenverschiebung das *At4CL1*-Protein kürzt und inaktiviert.

Der zweite Ansatz beruht auf Hybridisierung von Filtern, die Transposomflankierende DNA-Fragmente von 8.640 individuellen Linien tragen, was etwa 50.000 individuellen Insertionen entspricht. Mit DIG-markierte genspezifische Sonden lassen sich mögliche Insertionen identifizieren. Eine Hybridisierung mit *At4CL3* wurde durchgeführt.

Ein weiteres System zur Mutagenisierung von *A. thaliana* basierend auf dem Mais *En/dSpm* Element wurde von dem Sainsbury Laboratory (John Innes Center, Norwich, UK) entwickelt. Hierbei trägt ein einzelnes T-DNA Konstrukt ein nicht-autonomes Element, das Phosphinotrizinherbizid-Resistenz (*BAR*-Gen) vermittelt, sowie die Transposase gekoppelt mit einem gegenselektierbaren Marker. Nach Transposition konnte durch die Gegenselektion die Transposase von dem somit immobilisierten Element getrennt werden. Stabile Einzelkopien tragende Integrationslinien (SLAT lines, Sainsbury Laboratory *Arabidopsis thaliana* Transposants) wurden so erzeugt. Zu Beginn dieser Arbeit existierten etwa 48.000 Linien, die jeweils in Unterpools von 50 zusammengefasst waren. DNA, extrahiert von diesen Linien wurde in inverser PCR (iPCR) eingesetzt um dem Transposon benachbarte Regionen zu amplifizieren. Die Produkte wurden auf Membranen übertragen, 864 Pools, werden repräsentiert durch eine Kombination von 18 Hauptpools, jeweils mit 48 Untergruppen, die ihrerseits die 50 Einzellinien tragen. Hybridisierung der Membranen mit genspezifischen, DIG-markierten Sonden identifiziert die Koordinaten mutmaßlich positiver Pools, zusammengesetzt aus dem Haupt- und Unterpool.

Ein von Jonathan Jones (Sainsbury Laboratory) freundlicherweise zur Verfügung gestellter SLAT-Filter (Nr. MM36) wurde mit einer DIG-markierten *At4CL1*, *At4CL3* und *At4CL4*-spezifischen Sonden hybridisiert. Eine ausführliche Beschreibung und Charakterisierung der Integrationslinien erfolgt im Ergebnisteil (Kapitel 3.3, Seite 90). Des Weiteren wurden flankierende Regionen systematisch sequenziert. Die Daten wurden in einer Datenbank (sequenced insertion sites, SINS) gesammelt, die zur Zeit 1.200 Sequenzen umfasst. Mit dem Internet-basierenden Programm BLAST lässt sich eine gegebene Sequenz mit dem Inhalt der Datenbank vergleichen,

übereinstimmende Sequenzen sind mit 50 Linien umfassenden Pools verknüpft. Alle *At4CLs*, sowie *AtC4H* und *AtCCoAOMT* wurden analysiert. Die aktuellsten Filter der SLAT-Population tragen iPCR Produkte von über 54.000 repräsentierten Linien. Dieser Filter (freundlicherweise von S. Robatzek zur Verfügung gestellt) wurde mit DIG-markierten Sonden von *At4CL3* und *At4CL4* hybridisiert.

T-DNA-Populationen

Die "Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library" (SAIL, vormals GARLIC) des Torrey Mesa Research Institute (TMRI, San Diego) besteht aus etwa 107.000 individuell T-DNA mutagenisierten *A. thaliana* Col-0. Mit der "*Thermal Asymmetric Interlaced-Polymerase Chain Reaction*" (TAIL-PCR) wurden flankierende Bereiche der Insertionen amplifiziert und sequenziert. Mittels eines FASTA Vergleichsalgorithmus wurde die TMRI Datenbank

(<http://www.nadii.com/pages/collaborations/garlicfiles/GarlicDescription.html>)

auf Insertionen in den Genen *At4CL1*, *At4CL3*, *At4CL4* und *AtC4H* hin durchsucht. Das "Salk Institute Genome Analysis Laboratory" (SIGnAL) bietet die Möglichkeit eine Datenbank über Internet-basierenden Zugriff zu durchsuchen. Enthalten sind 150.000 unabhängige T-DNA-angrenzende Sequenzen, Ökotyp Col-0, die mit der aktuellen Version des annotierten *A. thaliana* Genoms verglichen wurden. Ein sogenanntes "graphical interface-SIGnAL *Arabidopsis* Gene Mapping Tool" (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) erlaubt Zugriff sowohl auf die Sequenz- als auch Text-basierende Insertions Mutanten Datenbank. Es wurden die Gene *At4CL1*, *At4CL3* und *AtC4H* auf mögliche Insertionen hin überprüft.

Die GABI-KAT (Genom Analysen im Biologischen System Pflanze, Kölner Arabidopsis T-DNA Lines) Kollektion umfasst etwa 15.000 Linien im Hintergrund Col-0, deren sequenzierte flankierende Regionen kann mittels Text- BLAST- oder Annotierungssuche (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/db/>) durchsucht werden. Es wurden die Gene *At4CL1*, *At4CL2*, *At4CL3*, *At4CL4*, *At F5H*, *AtC4H* und *AtCCoMT* auf mögliche Insertionen hin überprüft.

Identifikation und Isolierung mutmaßlicher Einzellinien

Die Identifikation und Bestätigung mutmaßlich positiver Insertionsereignisse aus den mit oben genannten Methoden bestimmten Pools basierte auf PCRs mit Gen- und Transposon- bzw. T-DNA-spezifischen Oligonukleotiden auf Einzelpflanzen-DNA. Die entwickelte grundsätzliche Vorgehensweise ließ sich mit geringen Abwandlungen auf alle Populationen anwenden. Charakteristika der Populationen werden im Ergebnisteil weiter erläutert.

In Schalen mit 9x6 Feldern wurden 54 einzelne Nachkommen mutmaßlich positiver Linien angezogen. Nach Einzelpflanzen DNA-Extraktion wurden PCRs durchgeführt um den Genotyp der individuellen Pflanze zu ermitteln. Zur Kontrolle wurde DNA aus Reihen- und

Spalten gemischt und parallel eingesetzt, Signalkombinationen ergaben die redundanten Reihen- (A-F) und Spalten- (1-9) Koordinaten.

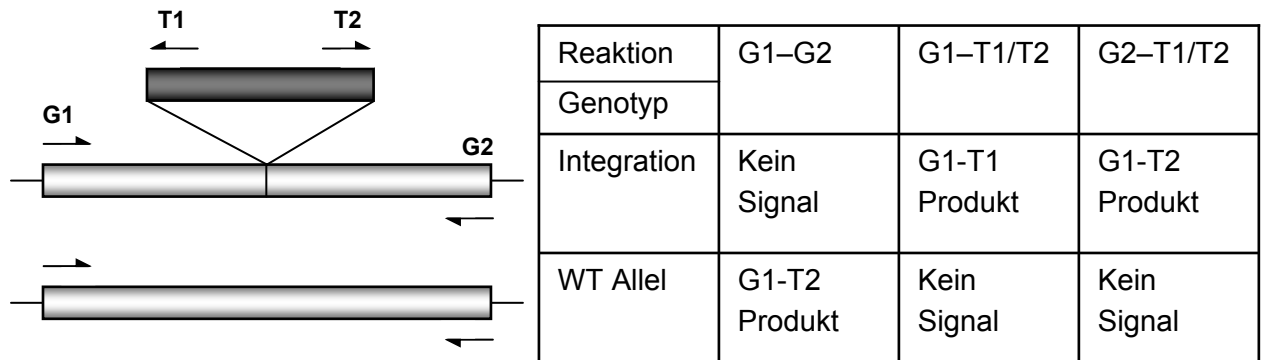


Abbildung 2: Nachweis einer T-DNA oder Transposonintegration im untersuchten Gen mittels der PCR.

G1 und G2 sind genspezifische Oligonukleotide, die Insertionsstelle flankieren, T1 und T2 sind T-DNA, bzw. transposonspezifische Primer. Durch die Integration wird das Gen unterbrochen, genspezifische Primer ergaben in diesem Fall der PCR kein Signal, die Insertion ließ sich durch Reaktionen der genspezifischen, kombiniert mit den Insertionsspezifischen Primern nachweisen.

Die Summe der Bandengrößen in den Reaktionen Integration 1 und 2 entsprach bei positivem Signal der genomischen Reaktion. Alle Linien wurden in der folgenden Generation durch Segregationsanalyse, bzw. PCR erneut überprüft.

EMS-generierte Populationen

Das *Arabidopsis* Tilling Projekt (Targeting Induced Local Lesions In Genomes, Department of Botany, University of Washington (USA), <http://tilling.fhcrc.org:9366/>) bietet die Durchsichtung einer Population von EMS mutagenisierten *A. thaliana* Col er105 ("Big Mama") im Rahmen eines Service Programms an.

Für die Analysen wurden DNA-Proben individueller M2 Nachkommen von Linien EMS behandelter Samen isoliert, während die Samen geerntet und inventarisiert wurden. DNA-Pools wurden mit genspezifischer PCR und der "CEL I mismatch cleavage enzyme" Methode untersucht. Hierbei wurden amplifikations-Produkte spezifisch an Fehlbindungsstellen in den Heteroduplexen geschnitten. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und Mutationen in den komplementären Strängen automatisiert analysiert. Nach der Wiederholung der Prozedur mit den Proben positiver DNA-Pools konnten Mutationen auf +/- 10 bp in den 1 kb DNA-Fragmenten lokalisiert werden.

Mit Hilfe der internetbasierenden CODDLE Software (Codons Optimized to Discover Deleterious Lesions, <http://www.proweb.org/input/>) wurde die genomische Sequenz von *AtC4H* auf Bereiche analysiert, in denen EMS-typische C/G→A/T Übergänge verstärkt zu Aminosäureaustauschen, bzw. der Erzeugung von Stopkodons führen. Eine 1 kb überspannende Region des ersten Exons, des ersten Introns und hundert Basenpaaren des zweiten Exons wurde ausgewählt und hierfür Oligonukleotide generiert. Mit diesen *AtC4H*-spezifischen Oligonukleotiden wurde dann vom Service

des Das *Arabidopsis* Tilling Projekts die Population auf Mutationen in der entsprechenden Region des Gens durchsichtet.

Das Ergebnis dieser Analyse ordnete jeder entdeckten Mutation eine direkte Verbindung zum ARBC/NASC *Arabidopsis* Stock Center zu, mit der die individuellen M2 Linien bestellt werden konnten. Der Genotyp der Mutation (homo- oder heterozygot) wurde ebenfalls bestimmt. Die Software PARSESNP (Project Aligned Related Sequences and Evaluate SNPs, <http://www.proweb.org/parsesnp/>) diente der Kartierung der Mutationen, identifizierte Änderungen von Restriktionsschnittstellen zur Differenzierung vom Wildtyp Gen und erlaubte Vorhersagen des Ergebnisses der Mutation auf Proteinebene.

2.6.5 Wildtyp und weitere mutagenisierte Linien

Wildtyp *A. thaliana* des Ökotyps Col-0 (Columbia (USA)) wurde vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center bezogen (NASC, N1093, M. Koorneef).

Die eingesetzte *AtCHS* Nullmutante tt4(85) (NASC, N8605, Sheahan *et al.*, 1993, Feinbaum und Ausubel, 1988) befindet sich im Landsberg *erecta* Hintergrund. Ein G nach A Austausch im ersten Exon der Sequenz des mutagenisierten *AtCHS*-Gens führt zu einem Austausch eines in 23 CHS Genen konservierten Serins zu Glycin. Dieser Tausch ist vermutlich für den beobachteten Phänotyp verantwortlich (Chen *et al.*, 1994).

Brenda W. Shirley stellte freundlicherweise die *AtCHS* Nullmutante tt4(2YY6) Mutante im *A. thaliana* Col-0 Hintergrund zur Verfügung (Burbulis *et al.*, 1996). Ein G nach A Austausch an der 3'-Spleissstelle des einzigen Introns des *AtCHS*-Gens ist vermutlich verantwortlich für den Ausfall der Flavonoid-Biosynthese (Shirley, 1995).

Die *AtF5H* Nullmutante fah1-2 im Col-0 Hintergrund wurde freundlicherweise von JC. Cusumano zur Verfügung gestellt (NASC, N6172, Chapple *et al.*, 1992). Der Genotyp der Mutation war bislang nicht charakterisiert (JC. Cusumano, pers. Mitteilung), es lagen keine genomischen Informationen zu der Mutante vor.

Nach der Identifikation von 4 mutmaßlich positiven SL4cl4 Subpools mit je 50 Einzellinien aus der SLAT-Population, wurden erste Analysen von der Firma GreenTec durchgeführt. Eine Rohsequenz die auf ein Insertionsereignis in *At4CL4* hindeutete, wurde von GreenTec ermittelt. Alle weiteren Arbeiten, die letztlich zu der Identifizierung und Isolierung einer homozygoten SL4cl4 Linie führten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt.

2.6.6 Erzeugung multipler Mutanten: Kreuzen von *A. thaliana*

Um die möglichen funktionellen Redundanzen zu überwinden, war es erforderlich *A. thaliana* Stoffwechselmutanten einzelner Gene über Kreuzungen miteinander zu kombinieren. Hierfür wurden paarweise bestätigte und homozygote Linien ausgewählt. Grundsätzlich wurden sowohl Mutanten des ersten als auch des zweiten Gens separat mit Pollen des jeweiligen mutagenisierten Partners bestäubt. In der Praxis erwies es sich aber als hilfreich, Pflanzen mit effizienten Markern (BASTA Resistenz, Sinapat-Defizienz) als Pollendonator einzusetzen bzw. die Kontrolle der Kreuzung über Komplementierung des Phänotyps (*transparent testa*, Sinapat-Defizienz) in der F1 Generation durchzuführen.

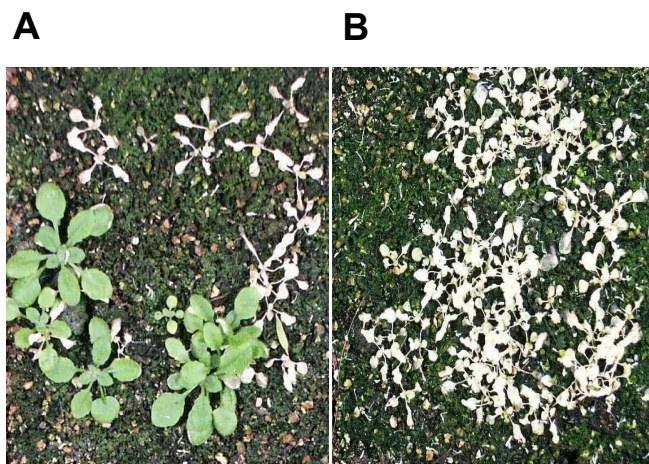


Abbildung 3: Herbizid-Selektion von Keimlingen.

10 Tage alte Keimlinge 2 Tage nach Behandlung mit dem Herbizid BASTA. **A** F1-Nachkommen einer resistenten Linie gekreuzt auf eine nicht-resistente Linie. Die vermittelte BASTA-Resistenz zeigt erfolgreiche Kreuzung. **B** Col-0, nicht-resistenter Wildtyp.

Die Kreuzungen wurden nach dem Protokoll der "Cold Spring Harbor *Arabidopsis* Molecular Genetics" (<http://www.msu.edu/user/delgadoi/Protocols.html>) durchgeführt.

2.6.7 Erzeugung multipler Mutanten: Identifizierung von Rekombinationsereignissen

Liegen zwei Gene auf einem Chromosom, so sind sie physikalisch verknüpft. Die homozygote Doppelmutante ist daher nicht direkt über Kreuzung beider Einzelmутanten zugänglich. In der Nachkommenschaft der heterozygoten F1-Generation muss daher nach Rekombinationsereignissen gesucht werden, bei denen durch Strangbrüche in den homologen Chromatiden während der Meiose Chromosomenbereiche ausgetauscht wurden. Ein solcher Bruch zwischen den beobachteten Genen vereint damit beide Allele auf einem Chromosom.

Um die erforderliche Größe der Population an F2-Pflanzen zu ermitteln, die das gesuchte Rekombinationsereignis enthält, sind genetische Karten mit Markern hilfreich.

Eine solche Karte wurde mit Hilfe von rekombinanten Inzuchtlinien der *A. thaliana* Ökotypen Columbia and Landsberg *erecta* (Lister and Dean, 1993) erstellt. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) stellen die größte Anzahl von Sequenzvariationen in den meisten Organismen dar (Cho *et al.*, 1999). Diese Polymorphismen liegen der hier eingesetzten Kartierung des *A. thaliana* Genoms zugrunde und sind im Stanford Genome Center (SGC) abrufbar.

Anhand den dort aufgeführten Markern, die physikalisch in der Nähe der gesuchten Gene liegen und deren genetische Position in cM angegeben ist, kann die genetische Distanz zwischen den Genen geschätzt werden. Diese genetische Distanz spiegelt die Rekombinationsfrequenz wieder. Die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination ist bereits in der F2 Generation gegeben und das Auftreten der homozygoten Doppelmutante lässt sich über folgende Berechnung ermitteln:

$$W = [1/4 \cdot (\text{Distanz in cM}/100)^2] \cdot 2$$

Für eine Sicherheit von 95% muss etwa die dreifache Menge an F2-Linien untersucht werden, um die homozygote Doppelmutation zu isolieren.

Nach der Selbstung einer einfach rekombinierten, heterozygoten Linie ist theoretisch in der F3 Generation die homozygote Doppelmutante wesentlich leichter zu ermitteln. Folgende Quellen wurden bei der Ermittlung der genetischen und physikalischen Distanz eingesetzt:

- http://nasc.nott.ac.uk/new_ri_map.html (TAIR Information)
- www.mips.gsf.de/proj/thal/db (zur Bestimmung der Position von BACs auf den Chromosomen).

2.6.8 Morphologische Untersuchungen

Die Auswahl geeigneter Mutantenlinien für entwicklungspezifische und morphologische Untersuchungen erfolgte nach folgendem Schema: zunächst wurden verschiedene Linien der Mutante parallel mit Wildtyp ausgesät und wenn möglich über BASTA-Selektion, HPTLC oder Samenfarbe auf Segregation überprüft. Homozygote, unbehandelte Pflanzen der überprüften *At4CL*-Nullmutantenlinien wurden mittels PCR auf genomischer Ebene bestätigt.

Direkte anatomische Vergleiche von Wildtyp- und Mutanten-Linien wurden mit einem Carl-Zeiss Binokular (0,8-fache Vergrößerung) durchgeführt.

Untersuchung der Keimlingsentwicklung

Die Anzucht von Col-0 und der *At4CL2* Nullmutante zum Vergleich möglicher entwicklungspezifischer Unterschiede erfolgte nach folgendem Protokoll: etwa 100 Samen wurden in keimfreien Säulchen mit Glasfritte oberflächensterilisiert (zwei Waschschriffe mit mit 70% Ethanol, 0,1% TWEEN, anschließend mit 100% Ethanol) und durch Zentrifugation getrocknet. Die Samen wurden in Petrischalen (\varnothing 9 cm) steril auf $\frac{1}{2}$ MS-Salz, 0,8 % Agar, 1 \times Gamborg's Vitamin-Mix, ohne Saccharose mit einem Zahnstocher in gleichem Abstand ausgebracht. Inkubation bei 4° C für 2d folgte die Anzucht unter Langtagbedingungen (18 h Licht, 6 h Dunkelheit, 20 °C), bzw. für die Dunkelkontrolle in abgedunkelten Behältern, in einem Lichtschrank. Nach der Keimung (Tag 0) wurden täglich die Positionen der Wurzelspitzen mit einem Scanner fotografiert, um nicht nur das Gesamtwachstum, sondern auch mögliche Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zu erfassen.

Lichtbehandlung

Es wurden zwei unterschiedliche Systeme zur Belichtung von Pflanzen mit UV-Licht bzw. UV-haltigem Weißlicht eingesetzt. Pflanzen wurden in einem Lichtschrank (UV Inkubationsschrank HT, Firma BioTron, Hilden) bei 20°C einer längeren Phase von Stunden bis hin zu zwei Tagen permanentem Licht ausgesetzt. Folgende Röhren waren installiert: vier Röhren TL18W/29 (weißes Licht, Philips Licht, Hamburg), drei Röhren TL18W/18blue (Philips) und zwei Sylvania Schwarzlicht, blau (OSRAM Sylvania, München).

Bestrahlungen mit kurzen Pulsen von kurzwelligem UV-Licht hoher Leistung wurden mit einem UV-Crosslinker (Stratagene) mit regulierbarer Energiedosis zwischen 20 bis 120 s durchgeführt (C. Martin, pers. Mitteilung).

Pflanzen wurden nach der Behandlung unter Standardbedingungen in einer Phytokammer für einen Tag weiter kultiviert, bevor auf morphologische Veränderungen untersucht wurde.

2.7 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle verwendeten gängigen molekularbiologischen Methoden, die in Laborhandbüchern z. B. in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben sind, sind nicht näher aufgeführt.

2.7.1 Restriktions-Endonukleasespaltung

Die Spaltung von DNA mit Restriktions-Endonukleasen wurde mit passenden Puffern nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt.

2.7.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCRs wurden unter Zugabe von genspezifischen Primern (Endkonzentration jeweils 0,5 µM), 10-50 ng genomischer DNA oder 1-5 ng Plasmid-DNA als Matrize, 0,2 mM eines dNTP-Mixes, 1U Taq- oder 2,5 U Pwo-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 25 µl in entsprechendem 1x PCR-Puffer angesetzt. In einem MJ-Research 225PTC Peltiercycler Gerät wurde die Amplifizierung in der Regel nach folgendem Schema durchgeführt:

94°C	2 min	25-40 Wiederholungen
94°C	30 s	
55-65°C	20 s	
72°C	1 min/1kb	
72°C	5 min	

2.7.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

In Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit, Minelute“ der Firma QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt.

2.7.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Isolierungen von Plasmiden aus Bakterien wurden im Mini-Maßstab nach der von Holmes und Quigley (1981) beschriebenen TELT-Methode durchgeführt. Plasmide, die in größeren Mengen benötigt wurden, wurden mit dem „Plasmid Maxi-Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

2.7.5 Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde der „RNeasy Plant Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden) eingesetzt. Pflanzenmaterial wurde im gekühlten Mörser in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und eine dem Pflanzenmaterial entsprechende Menge QRL-Puffer zugegeben. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

Alternativ kam die vorgemischte Phenol-Lösung RNAWiz (Ambion) zum Einsatz. Die Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Größere Mengen an Gesamt-RNA wurden mittels Phenol-Chloroform isoliert. Alle wässrigen Lösungen wurden zur Inaktivierung von RNAsen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat, Endkonzentration: 0,1 % (v/v)) mindestens 30 min inkubiert und anschließend autoklaviert. Zu 5 g fein zerriebenem Pflanzenmaterial wurden 10 ml Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,0, 100 mM NaCl, 20 mM EGTA, 2 % (w/v) SDS), 100 µl β-Mercaptoethanol und 10 ml gepuffertes Phenol gegeben, mindestens 20 min in einem Überkopfschüttler gemischt, 5 ml Chloroform zugegeben, erneut 15 min in einem Überkopfschüttler gemischt und 10 min mit 5000 UpM bei RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde abpipettiert und die Phenol-Chloroform-Fällung zweimal wiederholt. Wenn keine Interphase mehr vorhanden war, wurde einmal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und durch Zugabe von 1/10 Volumen Na-Acetat (3M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol die Nukleinsäuren bei -70 °C für mindestens 30 min gefällt. Nach einer Zentrifugation (30 min, 5000 UpM, 4 °C) wurde das Sediment in 5 ml Wasser resuspendiert und erneut durch Zugabe von 5 ml LiCl (4M) über Nacht im Eisbad gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 1,8 ml Wasser resuspendiert und die RNA mittels Na-Acetat-Fällung (s. o.) gefällt. Das nach Zentrifugation erhaltene Sediment wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und die RNA in 200 – 500 µl Wasser gelöst.

Die Isolierung von mRNA erfolgte mit einem „Dynabeads® mRNA DIRECT Kit“ (DYNAL, Oslo, Norwegen) entsprechend den Herstellerangaben.

2.7.6 Isolierung genomischer DNA

Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurde mit dem NucleonPhytopure Kit der Firma Amersham in Anlehnung an die Vorschrift durchgeführt. Die wichtigsten Änderungen beziehen sich auf die Anpassung des Protokolls an hohen Durchsatz und beinhalten die im Folgenden beschriebenen Details.

Zwischen 25 bis 50 mg Gewebe wurde frisch in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen und mittels Silicabeads (Durchmesser 0,5 mm, Firma Roth, Karlsruhe) im BeadBeater (BioSpec Products, Oklahoma) für 30 sec bei RT homogenisiert. Nach Zugabe von 600 µl Puffer 1 wurde das Homogenat durchmischt und mit weiteren 200 µl Puffer 2 versetzt für 10 min auf 65°C erhitzt. Nach 20 min auf Eis wurden 75 µl der Suspension (PhytoPure DNA extraction resin suspension) und 500 µl Chloroform zupipettiert und die Proben für 30 min auf einem Überkopfschüttler gemischt. Im Anschluss wurden die Phasen durch Zentrifugation (0,8 g, Eppendorf

Tischzentrifuge) getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde nach Abtrennung mit 10 µl RNase Lösung (10 mg/ml) versetzt und erneuter Zentrifugation (15.000 UpM, 30 min, RT, Heraeus Biofuge Primo R) unterworfen. Der klare Überstand wurde nach Überführung in ein frisches Reaktionsgefäß mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und die DNA durch Zentrifugation (15.000 UpM, 30 min, RT, Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert. Im Anschluss an einen Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 35 µl 10 mM Tris/HCl pH8 resuspendiert. Quantifikation und Bestimmung der Reinheit wurde mittels des Eppendorf BioPhotometers optisch mit 2µl in 75µl Wasser in UV-durchlässigen Küvetten durchgeführt. Diese quantifizierten Lösungen dienten als Template bei allen PCR-basierenden Experimenten zur Bestimmung des Genotyps individueller Pflanzen.

Zur Isolierung größerer Mengen an genomischer DNA aus *A. thaliana* wurden circa 5 g Blattmaterial zu einem feinen Pulver zerrieben, 22 ml auf 65 °C vorgewärmter 2×CTAB-Puffer (2 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl, 1 % Polyvinylpyrrolidon (PVP, M_r 40000), 2 % β-Mercaptoethanol) zugeben und für mind. 1 h bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurden die Ansätze 10 min auf einem Überkopfschüttler gemischt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (15 min, 5000 UpM, 15 °C) wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und 10 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 5000 UpM, 15 °C) wurde die sedimentierte DNA in 1 – 5 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert, 10 µl RNase A (10 mg/ml, vorgekocht) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung wurde wiederholt und nach Phasentrennung zu der wässrigen Phase 0,7 Volumen Ethanol, 0,2 Volumen 3 M Na-Acetat zugegeben, zentrifugiert und die sedimentierte DNA zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 200 –500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst und bei 4 °C gelagert.

2.7.7 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP mit Hilfe des „Random Primed DNA Labeling Kits“ (Boehringer, Mannheim) gemäß Herstellerangaben (Feinberg and Vogelstein, 1983). Nicht eingebaute Desoxynukleotide wurden mittels einer Gelfiltration (Sephadex G25 superfine, Pharmacia, Freiburg) aus dem Reaktionsansatz entfernt.

2.7.8 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Für DNA-Blot-Analysen (Southern, 1975) wurden 10 µg genomische DNA mit den entsprechenden Restriktions-Endonukleasen verdaut, im 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel für 15 Minuten in 0,25 N HCl,

anschließend einige Minuten in 0,4 NaOH gespült. Der Transfer erfolgte mit 0,4 N NaOH in einem *downward*-Verfahren (Koetsier *et al.*, 1993).

Für RNA-Blot-Analysen wurden 20 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die vor der Elektrophorese mit 1 Volumen RNA-Auftragmix (60 % (v/v) Formamid, 22 % (v/v) Formaldehyd (37 %), 18 % (v/v) 10×MOPS-Puffer) gemischt und durch eine 15minütige Inkubation bei 60 °C denaturiert wurde. Die Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte in einem denaturierenden 1,3%igen Agarosegel.

2.7.9 Herstellung nichtradioaktiver Hybridisierungssonden

DIG-markierte Kontrollsonde für SLAT Membranen

Zur Kontrolle und präzisen späteren Ausrichtung des Filters wurde zunächst die DIG markierte Kontrollsonde nach Angaben des Protokolls ausgehend von 50 ng 1 kb DNA Leiter (GibcoBRL, Paesley, GB) mit Hilfe des „Random Primed DNA Labeling Kits“ (Boehringer, Mannheim) gemäß Herstellerangaben (Feinberg and Vogelstein, 1983) mit DIG-markiertem DIG-dCTP synthetisiert.

DIG-markierte spezifische Sonden

DIG-markierte Sonden spezifischer Gene wurden im Anschluss für die Hybridisierung des SLAT-Filters benötigt. Die Herstellung erfolgte mit Hilfe des „PCR DIG Probe synthesis Kits“ der Firma Roche (Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Voll-Längen Sonden wurden mit Oligonukleotiden erzeugt, die den gesamten kodierenden Bereich umfassen.

2.7.10 Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren

Die radioaktive Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren erfolgte in verschließbaren Glasröhren über Nacht in einem Rollinkubator bei 50 - 65 °C.

Die Nylonmembran mit den fixierten Nukleinsäuren wurde zuvor für mindestens zwei Stunden ohne Sonde prähybridisiert (1 M NaCl, 1 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Dextransulfat). Die fünf Minuten bei 95 °C denaturierte DNA-Sonde wurde anschließend dem Ansatz hinzugefügt. Nach der Über-Nacht-Inkubation wurde die Membran zweimal 30 Minuten in 0,2×SSC, 0,5 % (w/v) SDS bei 50 - 65 °C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Die Membranen wurden in Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm bedeckt bei -80 °C für mehrere Stunden bis zu zwei Wochen zwischen Trimax-Verstärkerfolien exponiert.

Für eine Rehybridisierung wurde der Filter eine Stunde in 0,1 % SDS bei 80 °C gewaschen. Auf diese Weise wurden gebundene Sondenmoleküle entfernt und somit eine erneute Hybridisierung zu ermöglicht.

Analog wurde die Hybridisierung DIG-markierter Sonden durchgeführt. Die Hybridisierungslösung DIG Easyhyb (Boehringer, Mannheim) wurde in allen Experimenten standardisiert bei 42°C eingesetzt. Die Antikörperreaktion zur Detektion der Signale, sowie die Entwicklung und Exposition wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Hybridisierungen von membrangebundener RNA wurde mit radioaktiv markierten Sonden in ULTRAHyb (Ambion) durchgeführt, einer halben Stunde Prähybridisierung

bei 42°C folgte Inkubation mit der radioaktiven Sonde über Nacht bei gleicher Temperatur. Stringente Waschschriffe bei 65 - 68°C (0,2×SSC, 0,5 % (w/v) SDS, zweimal 30 Minuten) entsprachen dem Standardprotokoll. Autoradiographie erfolgte in Folien eingeschweißt mit einem Röntgenfilm bedeckt bei -80 °C für mehrere Stunden bis zu zwei Wochen zwischen Trimax-Verstärkerfolien.

2.7.11 RT-PCR zur Expressionsanalyse von *At4CL4*

Primerentwicklung

Die Untersuchung der Expression eines Gens einer Gen-Familie birgt das Problem unspezifischer Detektion homologer Familienmitglieder. Daher ist die Entwicklung spezifischer Oligonukleotide ein zentraler Punkt der RT-PCR zur Analyse der *At4CL4* Expression. Bei der Gewebespezifischen Analyse sollten zudem zum Vergleich alle anderen Mitglieder der Familie einbezogen werden.

Oligonukleotide für die RT-PCR müssen folgende Kriterien erfüllen:

- Spezifität für das jeweiligen Gen
- Überspannen einer Intron-Intron Grenze auf cDNA Ebene
- Schmelztemperatur ähnlich aller weiteren eingesetzten Oligonukleotide
- Flankieren eines Bereichs ähnlicher Größe zu den drei weiteren Genen

Hierauf basierend wurden mit den Programmen Amplify v1.2 (William Engels, Genetics Department, University of Wisconsin, Madison, USA) und Vector NTI v5.0 (Informax) zunächst mögliche Positionen ausgewählt. Hierfür wurde mit Hilfe eines Gradientenblocks eine optimale Bindetemperatur aller Primerpaare ermittelt. Die entsprechenden Primer wurden anschließend über PCR in einer Maschine der gleichen Bauserie (MJ Research PTC-225) gegen klonierte cDNA aller *At4CLs* (100 pg) sowie genomische DNA (50 ng) getestet um Spezifität zu gewährleisten.

Herstellung der Matrize über reverse Transkription (RT) für die PCR

Da es erforderlich ist in allen nachfolgenden Reaktionen identische Mengen der Matrize vergleichbarer Qualität einzusetzen, wurde die zwei-Gefäß RT-PCR für die Untersuchung verwendet. Mit dieser Methode wurde in zwei getrennten Reaktionen zunächst über die RT cDNA erzeugt, die dann in den nachfolgenden PCR in parallelen Reaktionen als vergleichbare Matrize eingesetzt werden konnte.

Die zuvor auf *Northern*-Ebene eingesetzte gesamt RNA aus verschiedenen Geweben wurde photometrisch mit Hilfe des *BioPhotometers* (Eppendorf) quantifiziert und die Konzentrationen der Proben gegeneinander abgeglichen.

20 µg gesamt RNA wurden mit der SuperScript II RNase H⁻ (GibcoBRL) nach Angaben des Herstellers im mitgelieferten Puffer unter Verwendung eines Oligo (dT)₂₂V Oligonukleotids (40 pmol) durchgeführt. Anschließend wurde die Konzentration erneut photometrisch überprüft und alle Produkte auf 375 ng/µl eingestellt.

PCR

Ein RnaseH-Dau ist nicht erforderlich um die entstandenen DNA-RNA Hybridstränge zu trennen, da die Größe der zu erzeugenden Produkte 791 bp nicht überschreitet. Von der über die RT erzeugten cDNA Matrize wurden in allen PCR die gleichen,

zuvor quantifizierten und aufeinander abgestimmten Volumina eingesetzt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten war es erforderlich, alle Reaktionen parallel in einem Block mit identischem Programm durchzuführen. Der Standard Reaktionsansatz dieser PCR enthält in einem Volumen von 25 µl folgende Lösungen:

Matrize	1,5 µl RT Produkt (375 ng/µl)
Polymerase	0,25 µl Taq-DNA Polymerase (Roche, 5u/µl)
Puffer	2,5 µl 10-fach konzentriert
dNTPs	0,25 µl (Roche, 10 mM)
Oligonukleotid1/ Oligonukleotid2	je 0,3 µl (Metabion, 10 µM).

Die Reaktion wurde in einer MJ Research PTC-225 mit folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	94°C, 2 min	
Denaturierung	94°C, 15 s	} 30 Zyklen
Oligonukleotidbindung	72°C, 30 s	
Oligonukleotidextention	72°C, 15 s	

Grundsätzlich wurde der Block zunächst auf die Denaturierungstemperatur gebracht bevor die Proben geladen wurden, um unspezifische Amplifikation fehlgebundener Oligonukleotide zu verhindern. 15 µl der entstandenen Produkte wurden in 2% TAE-Agarosegelen aufgetrennt und die Banden mittels Ethidiumbromid auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Zur Kontrolle wurden die revers transkribierten RNA-Proben in einer PCR für das konstitutiv exprimierte *AtActin1* (*A. thaliana* ACT1, gi:166581, Locus ATHACT1A, Oligonukleotid act_for liegt im ersten und Oligonukleotid act_rev im dritten Exon) unter folgenden Bedingungen eingesetzt: T(a) = 60°C, t(72°C) = 30s, Zyklen = 25/35. Genomische Kontamination ergäbe 733 bp, die Größe des Signals auf cDNA beträgt 503 bp.

2.7.12 Rechnergestützte Sequenzanalysen

DNA-Sequenzierung und Auswertung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Servicegruppe ADIS des Max-Planck-Instituts mit Hilfe eines automatischen Verfahrens der Firma Applied Biosystems nach der Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden mit den Programmen der unixbasierenden Software GCG bestfit, gap und pileup (GCG-Softwarepaket Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisc., USA) sowie dem Programmpaket VectorNTI6.0 (Informatica) ausgewertet.

Internetrecherchen, Analysealgorithmen und lokale Datenbanken

Die aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit zu bekannten At4CLs identifizierten Sequenzen (Algorithmen: BLAST (Altschul *et al.*, 1997) und FASTA (Lipman and Pearson, 1975)) wurden aus den drei größten primären Datenbanken (Genbank (USA), EMBL (England) und DDBJ (Japan)) heruntergeladen, vereinheitlicht und lokal mit dem Programm VectorNTI6.0 (Informatix) in einer Datenbank zusammengefasst.

Erstellung des multiplen Alignments aller verfügbaren 4CL-Sequenzen

Die Alignments aller zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten 4CL Proteinsequenzen, bzw. der aus den verfügbaren genomischen Daten abgeleiteten Proteinsequenzen wurden mit dem Programm pileup (progressiver paarweiser Vergleich aller Sequenzen zueinander, Vergleichsmatrix blosum62, Standardparameter gap creation 5, gap extension 1) des GCG-Softwarepakets erzeugt und manuell optimiert. Details werden ausführlich im Ergebnisteil (Kapitel 3.1, Seite 61) behandelt. Die Literaturquellen der charakterisierten 4CLs sind über ihre im Anhang wiedergegebenen Zugriffsnummern verfügbar, daher wurden in dieser Arbeit nur die für die weiteren Betrachtungen relevanten Publikationen gesondert zitiert.

Analyse des Reisgenoms

Die beiden großen öffentlichen Sequenzprojekte "International Rice Genome Sequencing Project" (Kultivar: *Oryza sativa* ssp. *japonica* c.v. Nipponbare) und der "Chinese Academy of Sciences; Beijing, China" (Kultivar: *Oryza sativa* L. ssp. *indica*) sowie etwa 10 kleinere Projekte stellen ihre Informationen über verschiedene Datenbanken, die miteinander abgeglichen werden, zur Verfügung.

Die für die Analyse zugrunde gelegten Datenressourcen des Reisgenom-Sequenzierungsprojekts von NCBI und TIGR decken die verfügbaren Informationen ab. Die Banken wurden zunächst mit dem Suchalgorithmus BLAST gegen die 4 At4CLs sowie die näher verwandten monokotyledonen 4CLs des Weidelgrases (*Lolium perenne*) und die bereits verfügbaren Reis 4CLs (*Oryza sativa*) verglichen. 10 entsprechende unabhängige BAC-Klone die genomische Rohsequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu den eingesetzten Sequenzen trugen, wurden auf offene Leserahmen untersucht. Alle Bereiche wurden nach Translation paarweise mit dem Programm gap (GCG-Programmpaket) dem 4CL-Konsensus (siehe Kap. 2.7.12, Internetrecherchen, Analysealgorithmen und lokale Datenbanken) angepasst, bis komplette Proteinsequenzen vorlagen. Anhand dieser Sequenzen wurden mutmaßliche Intron-Exon Grenzen vorhergesagt (VectorNTI V6.0) und mit den anderen Familienmitgliedern verglichen.

Eine weitere, limitierte Durchsichtung des vom Torrey Mesa Research Institute (TMRI, Syngenta (Goff *et al.*, 2002) sequenzierten Teils des Reisgenoms (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) wurde mit der Beschränkung auf 100 kb pro Woche gestattet. Die mutmaßlichen Os4CL3-5 wurden einer BLAST-Suche zugrundegelegt. Die Rohsequenzen von zwei weiteren, möglicherweise letzten Kandidaten der Os4CL-Familie in Reis wurden heruntergeladen und gegen beide öffentlichen Datenbanken mit beiden Kultivaren verglichen.

Phylogenetische Analysen

Alle phylogenetischen Analysen der 4CLs wurden auf der Basis des Alignments aller verfügbarer 4CL-Sequenzen (siehe Kap. 2.7.12, Erstellung des multiplen Alignments) mit dem Programm paupsearch des GCG-Softwarepakets durchgeführt, eingebunden ist PAUP (aktuelle Version 4.01, D.L. Swoffort und Olsen, 1990). Mit der Maximum-Parsimony-Methode wurde empirisch der phylogenetische Stammbaum gesucht, der den gegebenen Datensatz mit der geringsten Anzahl evolutionärer Schritte erklärt (Fitch, 1977). Die Längen der Äste von Parsimony-Bäumen können bei sehr großen Zeiträumen verzerrt wiedergegeben werden. Vergleichsweise erzeugte Bäume mit der Distanz-Methode (Neighbour-Joining-Methode zur Berechnung des Baums) ergaben die gleiche Topologie. Da der Schwerpunkt dieser Analyse aber nicht die Bestimmung der Distanzen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Gruppe zum Ziel hatte, sondern Erzeugung des phylogenetisch kürzesten Baums zur Beschreibung der Verwandtschaftsbeziehungen, wurden die erzeugten Parsimony-Bäume anhand von Vergleichen mit Distanz-Bäumen gesichert. Eingesetzte Algorithmen mit steigender Komplexität waren ClustalW, Neighbour-Joining (NJ), branch swapping-tree bisection and reconnection (TBR), und branch-and-bound (BB) der zu den sogenannten "exhaustive search"-Algorithmen zählt.

Bei der angewendeten heuristischen Methode mit der "branch swapping-tree bisection and reconnection"-Option (TBR) handelt es sich um einen Kompromiss aus Präzision und Genauigkeit. Das multiple Alignment wurde zunächst in beständige (invariant) und variable Positionen unterteilt. Die variablen Positionen wurden weiter in informative und nicht-informative Positionen differenziert. Alle informativen Positionen zweier Sequenzen wurden zunächst paarweise verglichen um eine Vorläufersequenz mit möglichst wenigen Substitutionen zu erhalten, die dann mit der nächsten Sequenz des Alignments verglichen wurde. Die Aminosäurepositionen wurden proportional zum Konsistenzindex, dem Maß für die Stabilität der Topologie des Stammbaums neu gewichtet und der Datensatz entsprechend der Wichtung erneut (rekursiv) analysiert. Als heuristische Suche müssen nicht zwingend alle besten Bäume gefunden werden. Alternative Methoden stellen die Neighbour-Joining-, sowie die Branch-and-Bound-Methoden dar. Erstere erlaubt gute Vorhersagen ohne hohe Genauigkeit, während die zweite Methode durch den exponentiell ansteigenden Rechenaufwand nur für kleine Datensätze zu verwenden ist.

Eine statistische Methode zur Überprüfung der Wahrscheinlichkeit der Verzweigungstopologie ist die "Bootstrap"-Analyse (Felsenstein, 1985). Dabei werden die Charaktere des Datensatzes zufällig neu zusammengesetzt. Mit diesem neu arrangierten Datensatz wird die Parsimony-Analyse erneut durchgeführt. Durch Vielfache Durchläufe (in der Regel >1000) und dem Vergleich der so ermittelten Stammbäume kann für jede Verzweigung des ursprünglichen Baums die Häufigkeit des Auftretens dieser Verzweigung in den "Bootstrap"-Wiederholungen als Signifikanzwert ("confidence index") angegeben werden.

Folgende internetbasierende Programme und Datenbanken wurden bei den Analysen eingesetzt:

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool for comparing gene and protein sequences against others in public databases, Genbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, EMBL , <http://www.ebi.ac.uk/fblast2/>, DDBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/homology/blast-e.shtml>)
- FASTA (EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> und DDBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html>)
- MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences GSF, <http://mips.gsf.de/> *A. thaliana* BACs und Contigs)
- NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
 - NCBI open reading frame finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)
 - NCBI BankIt direct submission tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt>)
 - ENTREZ (ENTREZ Search and Retrieval in GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>)
- PLACE Datenbank (K. Higo, Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Research Vol.27 No.1 pp. 297-300 <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>)
- Coddle (Codons Optimized to Discover Deleterious Lesions, <http://www.proweb.org/input/>)
- im Rahmen des *Arabidopsis* TILLING Projekts (<http://tilling.fhcrc.org:9366/>)
- TIGR (The Institute For Genomic Research, <http://tigrblast.tigr.org/euk-blast/>)
- TMRI, Zugriff Reisgenomdatenbank (Syngenta, Torrey Mesa Research Institute, <https://portal.tmri.org/rice/Login>)

Entwicklung einer Konsensusmatrix zur Identifikation und Evaluierung von mutmaßlichen *cis*-regulatorischer Elemente P, A, und L in Promotoren von Phenylpropanstoff-Genen Elementen

Durch die große Anzahl beschriebener Elemente konnte eine Analyse der Nukleotidverteilung über den Bereich der P, A und L Elemente durchgeführt werden. Die so erhaltene Häufigkeitsmatrix erlaubt im Vergleich mit dem bislang beschriebenen Konsensus eine präzisere Beurteilung eines mutmaßlichen Elements. Zudem eignet sich die Matrix für rechnergestützte Analysen großer Datensätze wie dem vorliegenden vollständigem *A. thaliana* Genom.

In der folgenden Tabelle ist die Häufigkeitsverteilung der Nukleotide in den jeweiligen Elementen dargestellt. Die unterschiedliche Anzahl der eingesetzten Elemente ist auf das Fehlen von Elementen in einzelnen Genen zurückzuführen.

BOX P

POS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	2	1	1	2	17	16	0	11	20	13	0	4	4	2
T	8	16	14	6	1	0	0	1	3	1	0	1	0	3
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	13	6	8	15	5	7	23	11	0	9	23	18	19	18

Anzahl der eingesetzten Elemente: 23

BOX L

POS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	2	0	1	1	21	0	0	7	20	1	1
T	11	3	17	7	0	2	0	14	0	0	0
G	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	6	18	3	13	0	19	21	0	1	20	20

Anzahl der eingesetzten Elemente: 21

BOX A

POS	1	2	3	4	5	6
A	1	0	1	0	0	1
T	0	2	0	19	4	3
G	0	1	16	0	2	0
C	18	16	3	0	13	16

Anzahl der eingesetzten Elemente: 19

Eine vollständige Liste der Gene findet sich im folgenden Abschnitt und entstammt folgenden Publikationen: Logemann *et al.* (1995) und Mizutani *et al.* (1997)

Anhand der Häufigkeit eines Nukleotids kann somit für jede Position innerhalb einer Promotorsequenz eine normierte Wertung durchgeführt werden, die sich folgendermaßen

ergibt:

$$W = \frac{\sum_{i=1}^n Pos(n) \frac{Wert}{\Sigma Matrixelemente}}{n}$$

Wobei W den normierten Wert eines mutmaßlichen Elements darstellt und sich zwischen 0 und W(opt) bewegt. Je näher der Wert eines Elements an W(opt) desto eher entspricht das Element der Matrix.

W(opt) ist der Wert eines hypothetisch perfekten Elements und beschreibt den Grad der Konservierung der Matrix. Bei einer hoch konservierten Matrix geht W(opt) nach 1 und erreicht 0.25 bei einer Matrix, die alle möglichen Permutationen ihres Elements enthält. Für die Boxen P, A, und L wurden für W(opt) folgende Werte ermittelt:

W(opt) P = 0.73

W(opt) A = 0.84

W(opt) L = 0.86

Somit sind die Elemente, die Box L definieren höher konserviert als Elemente, die in die Ähnlichkeitsmatrix von P eingehen.

Eingesetzt wurden P, A und L Elemente folgender Gene: *PcPAL1*, *PcPAL2*, *PcPAL3*, *PcPAL4*, *Pc4CL1*, *Pc4CL2*, *AtPAL1*, *AtPAL2*, *LePAL5*, *PsPAL1*, *PsPAL2*, *PvPAL2*, *PvPAL3*, *StPAL1*, *StPAL2*, *St4CL1*, *St4CL2* (Logemann *et al.*, 1995) und *AtC4H*, *AtPAL3* (Mizutani *et al.* 1997). *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Le*, *Lycopersicon esculentum*; *Pc*, *Petroselinum crispum*; *Ps*, *Pisum sativum*; *Pv*, *Phaseolus vulgaris*; *St*, *Solanum tuberosum*.

Analyse des Auftretens von W-Boxen in Promotoren von Phenylpropanstoffwechsel-Genen

Um in dieser Analyse möglichst vollständig die verfügbaren annotierten oder mutmaßlichen Phenylpropanstoffgene zu analysieren, wurden Gene verschiedenster Organismen durch einen BLAST-Suchlauf in der Datenbank MIPS, der Datenbank des NCBI oder durch ihre Annotierung in der ENTREZ Datenbank ermittelt, die Zugriff auf die drei größten primären Datenbanken (Genbank, NCBI (Benson *et al.* 2000), EMBL (Baker *et al.*, 2000), DDBJ (Tateno *et al.*, 2000)) erlaubt. Anschließend wurde nach Verfügbarkeit die Promotorsequenz stromaufwärts des annotierten ATG-Startcodons extrahiert und mit Hilfe der PLACE Datenbank auf das W-Box Motiv TTGACC in Richtung des kodierenden Stranges und der Gegenrichtung untersucht. Es wurden nur Sequenzen verglichen, deren Promotorsequenz eine Länge von mindestens 950 bp aufwies.

2.7.13 Herstellung und Analyse transgener Pflanzen

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Von den Plasmiden (pGPTV), die für die Transformation eingesetzt wurden, wurde die Integration von beiden Seiten ansequenziert. Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV3101) erfolgte durch Elektroporation. Herstellung elektrokompenter Agrobakterien: Bakterien von Platte in 100 ml YEB-Medium (5 g beef-extract, 1 g yeast-extract, 5 g Peptone 140, 5 g Saccharose, pH 7,2, ad 1 l) animpfen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 28 °C unter Schütteln inkubieren, abzentrifugieren und zweimal in 1 mM HEPES-Puffer, 10 % (v/v)

Glycerin, pH 7,5 waschen. Das Bakteriensediment in 800 µl 1 mM HEPES-Puffer, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5 resuspendieren und in 50 µl-Ansätzen bei –80 °C lagern. Zu 50 µl elektrokompenten Agrobakterien wurde 1 µg Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. In einem Elektroporationsgerät der Firma BioRad erfolgte die Transformation (2,5 kV, 25 µF, 400 Ω).

Stabile Transformation von *A. thaliana*

Die stabile Transformation erfolgt mit der *Floral-Dip*-Methode (Clough and Bent, 1998). Die Anzucht der *A. thaliana*-Pflanzen (Ökotyp Col-0, jeweils 5 Pflanzen in einem Topf, Ø 7 cm) erfolgte für drei bis fünf Wochen in Phytokammern unter Kurztagbedingungen und zur anschließenden Blühinduktion für weitere zwei bis drei Wochen unter Langtagbedingungen. Um eine vermehrte Bildung von Sekundär-Infloreszenzen anzuregen, wurde die Primär-Infloreszenz abgeschnitten. Die Transformation erfolgte, solange die Mehrzahl der Blüten noch geschlossen waren. Agrobakterien können nur innerhalb eines kurzen Zeitraums der Blütenentwicklung (bis zur Schließung des Lokulus) die Eianlagen transformieren (Bent, 2000).

Von den transformierten Agrobakterien wurde von der Platte eine Kolonie in 1 l YEB-Medium (Gentamycin: 25 µg/ml, Rifampicin: 100 µg/ml, Kanamycin: 50 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (20 min, 6000 UpM, 10 °C) und in einer 5%igen Saccharose-Lösung resuspendiert. Zu 400 ml dieser Bakterien-Suspension wurden 200 µl Silwet L-77 (Union Carbide) als Detergens hinzugefügt (Whalen *et al.*, 1991). Die Töpfe mit den *A. thaliana*-Pflanzen wurden in diese Suspension getaucht, so dass die Infloreszenzen vollständig eintauchten, kurz geschwenkt und zum Trocknen horizontal auf Tücher gelegt. Bis zur Samenreife wurden die Pflanzen ins Gewächshaus gestellt, wobei in den ersten zwei Tagen nach Transformation die Pflanzen mit einer Haube bedeckt wurden.

Analyse transgener Pflanzen

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden oberflächensterilisiert (zweimal 2 min 70 % Ethanol, einmal 2 min 100 % Ethanol) und auf Selektionsplatten (0,5×MS-Salz (Sigma), 1×Vitamin-Mix, 250 µg/ml Claforan (Cefotaxim-Natrium, Hoechst AG), 70 µg/ml Kanamycin 0,8 % Agar) ausgesät. Die Kanamycin-resistenten Pflanzen wurden als Primärtransformanten bezeichnet. Die aus einer Selbstung dieser Pflanze hervorgegangenen Samen bildeten die T1-Generation. Bei einer Einfach-Integration des Transgens wurde in vielen Fällen nach Kanamycin-Selektion auch die erwartete 1:2:1-Aufspaltung näherungsweise beobachtet. Transgene Pflanzen mit einer Mehrfach-Integration können auch in der T2-Generation noch segregieren. Die GFP-Fusionslinien wurden in der T2-Generation analysiert, wobei über Selektionsplatten die Anwesenheit des Transgens bestätigt wurde.

2.8 Proteinanalytik: Expression von At4CL4 in E.coli

2.8.1 Herstellung der Expressionsvektoren

Erste Serie: Klonierungsstrategie At4CL4 in pQE-70

Der Qiagen Expressionsvektor pQE-70 wurde bislang für die heterologe Expression von At4CLs erfolgreich eingesetzt. Analog sollte At4CL4 ausgehend von PCR-amplifizierter cDNA über zwei Fragmente in die SphI /BamHI Restriktionsschnittstellen des Vektors kloniert werden. Die Amplifikation erfolgte aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus unter Verwendung einer zweistufigen geschachtelten PCR (Oligonukleotide aufgeführt in Kap. 2.3). Hierfür wurden Polymerasen mit Exonukleaseaktivität (*proof-reading*, Pwo, Triplmaster (Eppendorf)) unter Bedingungen eingesetzt, die hohe Spezifität gewährleisteten. Als Template diente cDNA von elicitorbehandelter *A. thaliana* Zellkultur (freundlicherweise von H. Heise zur Verfügung gestellt). Die Fragmente wurden inklusive der endogenen Nukleotide der Start- und Stopkodons amplifiziert und nach entsprechenden Restriktionsendonuklease-Behandlungen aus Subklonierungsvektoren (pTOPO (Invitrogen)) in den geöffneten und dephosphorylierten Expressionsvektor transferiert. Essentiell erforderlich war die Transformation der rekombinanten At4CL4 tragenden Expressionsplasmide in E.coli Stämme (XL1-blue, pSURE (Stratagene)) mit starken LacZ-Repressoren wie der lacI^q Mutation bzw. dem pREP4 Repressorplasmid, um das uninduzierte Expressionsniveau der Kulturen auf ein Minimum zu reduzieren.

Kontrolle der Klone erfolgte über PCR mit einer Oligonukleotid-Kombination spezifisch für At4CL4 und dem Vektor bzw. einer Restriktionsendonukleasebehandlung.

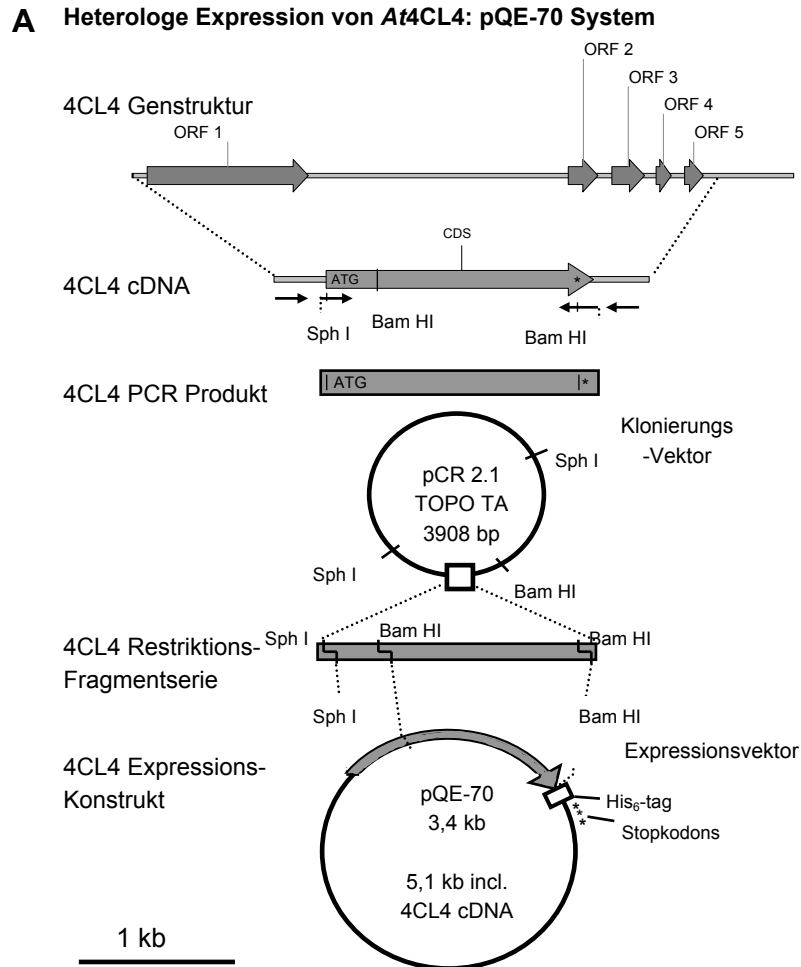


Abbildung 4: Schema der Klonierungsstrategie At4CL4 für heterologe Expression in *E. coli*.

Nach der reversen Transkription wurde der codierende Bereich von At4CL4 inclusive des endogenen Start- und Stopcodons über PCR amplifiziert und subkloniert. Partialem Restriktionsdau lieferte das Insertionsfragment für die Klonierung in den Expressionsvektor pQE-70 mit C-terminalem His₆-tag.

Heterologe Expression rekombinanter At4CL4 pQE-70 Klone

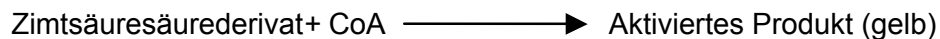
Nach Transformation des rekombinanten Expressionsplasmids in den *E. coli* Expressionsstamm M15 wurden separate Transformationsansätze nach der Regenerationsphase direkt in 2xLB Starterkultur mit dem Antibiotikum für den Erhalt des Repressor-Plasmids (Kanamycin) und des Vektors (Ampicillin) überführt. Nach einer Wachstumsphase von 12 h wurde das Zellpellet in frisches Kanamycin-freies Medium überführt und weitere 2-3 h bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0.6 bis 0.7 erreicht war. Durch Zugabe von IPTG sollte die Expression des heterologen At4CL4 induziert werden. Nach weitem 3 h wurden die Kulturen pelletiert, eine separate Probe von 1 ml diente jeweils der Überprüfung erfolgreicher Induktion mittels eines SDS-PAGE und Färbung der Proteinbanden mit Bio-Coomassie (Biorad), bzw. durch Silberfärbung.

Schnelltest rekombinanter Klone auf Enzymaktivität und Substratspezifität

Zur Durchsichtung einer großen Zahl an rekombinanten *E. coli*-Klone eignet sich ein einfacher Multititerplattentest (HP. Stuible, pers. Mitteilung). Rekombinante Klone, die in der Lage sind heterolog aktive At4CL-Enzyme zu exprimieren, ließen sich hiermit schnell identifizieren.

Einzelkolonien wurden separiert auf Induktionsplatten (LB/agar (1,2 %), 1,8 g IPTG/L) ausgestrichen und 10 h bei 37°C inkubiert. In einer 96-Felder Multititerplatte wurden 50 µl Lysozymbilung vorgelegt, sowie 50 µl CoA-Lösung, 50 µl Testlösung und 50 µl der zu untersuchenden Substratlösung. Mit der Impföse wurden Bakterien von der Induktionsplatte in die einzelnen Felder übertragen. Nach etwa 5 min zeigten ablaufende Reaktionen der Kontrollen und entsprechender Klone die charakteristische Gelbfärbung in den Feldern.

Hierbei katalysieren 4CLs folgende charakteristische Reaktion:



Positive Klone konnten somit isoliert werden, ebenso wie ein erster Eindruck über die jeweilige Substratspezifität gewonnen wurde.

Zweite Serie: Klonierungsstrategie At4CL4 in pET-30 (Novagen)

Das pET System ist ein Klonierungs- und Expressionssystem für rekombinante Proteine in *E. coli*. Unter der Kontrolle des starken Bakteriophagen T7 Transkriptions- und Translationssignals wird die Expression in der Zelle ausschließlich durch die T7-RNA-Polymerase induziert. Expression in Zellen ohne die Polymerase ist somit vollständig unterbunden und Plasmid-Instabilität durch potentiell toxische Effekte der exprimierten Proteine vermieden.

Die vollständige kodierende Region von At4CL4 wurde ausgehend von cDNA nach Amplifikation über NdeI/XhoI Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor kloniert. Die Amplifikation erfolgte mit den in Kap. 2.3 aufgeführten Oligonukleotiden. Hierfür wurde eine Polymerase mit Exonukleaseaktivität (Triplmaster, Eppendorf) unter Bedingungen eingesetzt, die hohe Spezifität gewährleisteten. Als Template diente cDNA von elicitorbehandelter *A. thaliana* Zellkultur. Die Fragmente wurden inklusive der endogenen Nukleotide der Start- und Stopkodons amplifiziert und nach entsprechenden Restriktionseendonuklease-Behandlungen aus Subklonierungsvektoren (pDRIVE, Qiagen) in den geöffneten und dephosphorylierten Expressionsvektor transferiert.

Essentiell erforderlich war die Transformation der rekombinanten At4CL4 tragenden Expressionsplasmide in *E. coli* Stämme (XL1-blue, pSURE (Stratagene)) mit starken LacZ-Repressoren wie der lacI^q Mutation bzw. dem pREP4 Repressorplasmid, um das uninduzierte Expressionsniveau der Kulturen auf ein Minimum zu reduzieren.

Kontrolle der Klone erfolgte über PCR mit einer Oligonukleotid-Kombination spezifisch für *At4CL4* und den Vektor, bzw. einem Restriktionsdau. Für die Expression und Aufreinigung eingesetzte Klone wurden ansequenziert, um den Promotor, die Schnittstellen, die kodierende Region und den C-terminalen His₆-tag zu überprüfen.

B Heterologe Expression von *At4CL4*: pET-30 System

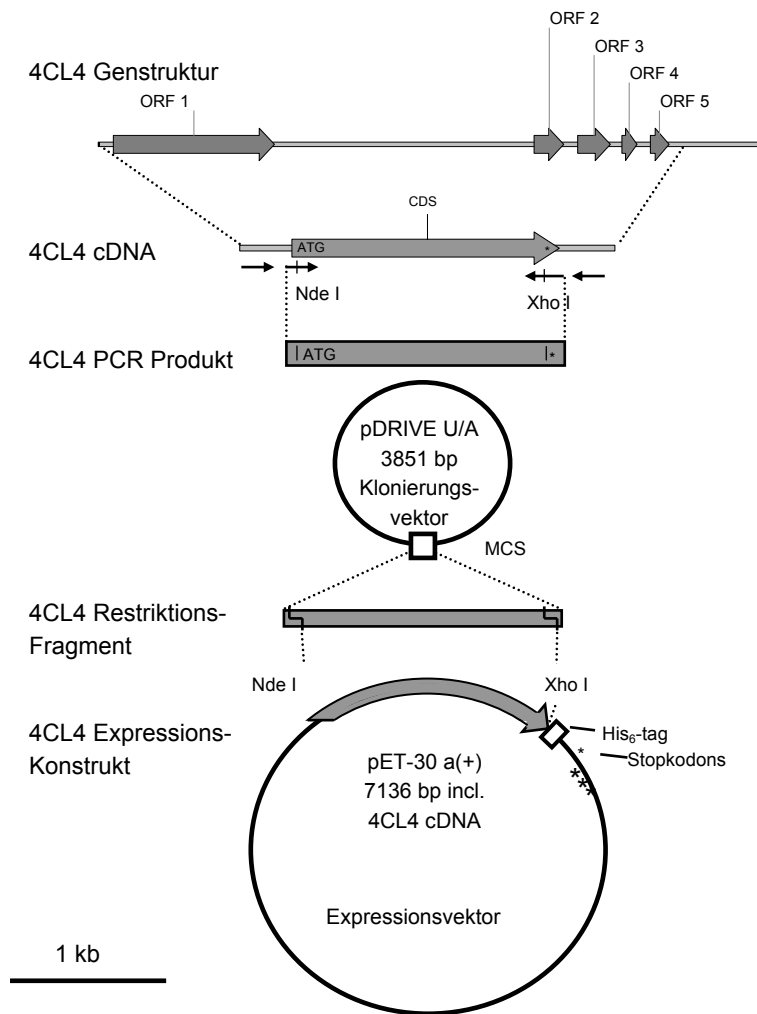


Abbildung 5: Schema der alternativen Klonierungsstrategie *At4CL4* für heterologe Expression in *E. coli*.

Nach der reversen Transkription wurde der codierende Bereich von *At4CL4* inclusive des endogenen Start- und Stopcodons über PCR amplifiziert und subkloniert. Restriktionsdau lieferte das Insertionsfragment für die Klonierung in den Expressionsvektor pET-30 mit C-terminalem His₆-tag.

2.8.2 Expression der Proteine

Alle Bakterienkulturen wurden in LB-Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin zugesetzt wurden, bei 37 °C und 220 UpM inkubiert. Von entsprechenden Übernacht-Kulturen wurden im Verhältnis 1:50 Kulturen angesetzt, die bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 wuchsen. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,01 bis 2 mM. Nach ein- bis vierstündiger Inkubation bei 30 bis 37 °C wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert und je nach weiterem Vorgehen in verschiedenen Puffern resuspendiert.

2.8.3 Herstellung von Proteinextrakten

Rohextrakte von Bakterien wurden durch Resuspension der sedimentierten Bakterien in 1×Laemmli-Probenpuffer (30 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerin, 2,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,0005 % (w/v) Bromphenolblau) hergestellt (Laemmli, 1970).

Für eine native Aufreinigung der Proteine wurden die sedimentierten Bakterien in einem Phosphatpuffer resuspendiert und im Eisbad achtmal jeweils 5 s mit Ultraschall (200 – 300 W) lysiert.

Für die Herstellung von Proteinextrakten verschiedener *A. thaliana*-Gewebe wurde circa 2 g Pflanzenmaterial gemörsert, in 2 ml Aufschlusspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) aufgenommen, im Eisbad 30 min gerührt, 0,2 g gespültes und gepuffertes Dowex zugegeben, wieder im Eisbad 30 min gerührt und nach Zentrifugation (10 min, 10000 UpM, 4 °C) der Überstand abgenommen und bei –20 °C gelagert.

2.8.4 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine über Nickel-NTA-Agarose

Der C-terminal an das At4CL4-Protein fusionierte His₆-tag ermöglichte eine Affinitätschromatographie über Nickel-NTA-Agarose. Die Affinitätschromatographie erfolgte sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen unter Verwendung des "Nickel-NTA Spin Kits" (QIAGEN, Hilden) gemäß Herstellerangaben.

2.8.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Anlehnung an Bradford (1976). Von der zu quantifizierenden Proteinlösung wurde ein Aliquot (1-10 µl) mit einer 1:4 (v/v) Mischung Wasser und Farbstofflösung (*Dye Reagent*, Biorad, München) versetzt. Die Messung der OD₅₉₅ (Cary 50 Bio UV/Vis Spektrophotometer mit der

Cary WIN-UV Software) erfolgte innerhalb der nächsten Stunde, die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve (BSA) ermittelt.

2.8.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 6%igen Sammelgel (0,4 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 6 % (w/v) Polyacrylamid, 0,025 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,1 % (v/v) TEMED) und einem 12%igen Trenngel (0,4 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 12 % (w/v) Polyacrylamid, 0,025 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,1 % (v/v) TEMED) (Laemmli, 1970).

Die Proteine wurden vor der Elektrophorese mit einem Volumen 1×Laemmli-Probenpuffer (30 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerin, 2,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,0005 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt, 5 min bei 95 °C denaturiert und bis zur Auftragung auf Eis gehalten.

2.8.7 Coomassie-Färbung

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine 10 min in Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250) unter leichtem Schwenken gefärbt und in Entfärbelösung (30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) bis zu einem klaren Hintergrund entfärbt.

2.8.8 Silber-Färbung

Im Vergleich zu einer Coomassie-Färbung ist eine Silberfärbung von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen deutlich sensitiver. Die Färbung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Blum *et al.* (1987). Alle Schritte erfolgten unter leichtem Schwenken. Eine Fixierung der Proteine erfolgte in einer mindestens einstündigen Inkubation in 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure. Danach wurde das Gel dreimal für 20 min in 50 % (v/v) Methanol gewaschen, mit Na₂S₂O₃ (0,2 g/l) 1 min vorbehandelt und anschließend 20 min mit AgNO₃ (2 g/l), Formaldehyd (0,75 ml (37%ig)/l) inkubiert. Nach dreimaligem jeweils einminütigem Spülen unter destilliertem Wasser erfolgte die Entwicklung nach Augenschein in Na₂CO₃ (60 g/l), 0,5 ml/l Formaldehyd (37%ig), Na₂S₂O₃ (5 mg/l). Ein Abstoppen der Entwicklungsreaktion erfolgte durch Spülen des Gels in 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure.

2.8.9 Protein-Blot-Analyse

Der Elektrotransfer von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine in Methanol aktivierte und im Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran (Millipore, Bedford, USA) erfolgte im Nassblotverfahren in einer Elektrophorese-Minikammer

(Hoefer Scientific Instruments, California, USA) mit einem Transferpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol) für mindestens zwei Stunden bei einer konstanten Spannung von 80 V und einer Temperatur von 4°C.

Nach dem Transfer wurde zur Ladungskontrolle der Blot mit "SYPRO Ruby Protein Blot Stain" (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) nach Herstellerangaben angefärbt und unter UV-Licht photographiert.

2.8.10 Immunologische Detektion von Proteinen

Zur Reduktion des Hintergrunds wurde die PVDF-Membran (siehe Kap. 2.8.9) mit Blockpuffer (5% (w/v) Suspension von fettarmem Milchpulver in TBS (50 mM Tris/HCl pH7,8; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂)) abgesättigt (15 min Schütteln, RT). Der primäre, heterologe Antikörper wurde aus Kaninchen gewonnen, die zuvor mit *Pc4CL* immunisiert worden waren (Ragg und Hahlbrock, 1981). Die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:1500 verdünnt im Blockpuffer) erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran viermal für je 15 min in TBS mit 0.1% Tween20 gewaschen. Zur enzymatische Detektion der primären Antikörper wurden Peroxidase gekoppelte Ziege-Anit-Kaninchen-Immunglobuline (1:2500 verdünnt im Blockpuffer) eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 2 h bei RT. Danach wurde die Membran viermal für je 15 min in TBS mit 0.1% Tween20 gewaschen. Mit Hilfe des Substrats "ECL Western Blotting Detection Reagent" (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und der mitgelieferten Puffer wurde die Lumineszenzreaktion nach Angaben des Herstellers mit einem Röntgenfilm detektiert (20 sec – 5 min Exposition).

2.8.11 Bestimmung der 4CL4-Aktivität

Die 4CL-Aktivität wurde mittels eines spektrophotometrischen Testsystems gemessen (Knobloch und Hahlbrock, 1974). Folgende Tabelle enthält die verwendeten Substrate (Sigma, Deisenhofen), sowie die Absorptionsmaxima der entstehenden CoA-Ester (Gross und Zenk, 1966; Stöckigt und Zenk, 1975) bei der die Umsetzungen beobachtet wurden:

Zimtsäure	311 nm
4-Coumarsäure	333 nm
Kaffeesäure	346 nm
Ferulasäure	345 nm
Sinapinsäure	352 nm
3,4 Dimethoxyzimtsäure	346 nm
3,5 Dimethoxyzimtsäure	348 nm
3,4,5 Trimethoxyzimtsäure	342 nm.

Während im Testansatz die Mengen an Substrat variierten, wurden die Konzentrationen der nötigen Cofaktoren ATP, CoA und Mg-Ionen konstant gehalten.

Testlösung
 4,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 7,8
 1,2 ml 0,5 M MgCl₂
 360 mg ATP
 48 µl 0,5 M DTE
 0,3 ml 4 M KOH

CoenzymA-Lösung 26,1 mg mg CoenzymA
 4 µl 0,5 M DTE
 in 5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 7,8

Die verschiedenen Substratlösungen wurden in Konzentrationsreihen von 0.25 mM bis zu 10 mM eingesetzt. Ein Standardansatz für die enzymatische Reaktion enthielt:

820 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,8
 50 µl Testlösung
 30 µl Enzymlösung
 50 µl Substratlösung.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl CoA-Lösung gestartet. Die Absorptionzunahme wurde gegen einen Kontrollansatz ohne CoA-Lösung über einen Zeitraum von 7 min in 1 min Intervallen gemessen.

Mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten (Gross und Zenk, 1966; Stöckigt und Zenk, 1975; Knobloch und Hahlbrock, 1974) wurde die katalytische Aktivität bestimmt. Die spezifische Aktivität ist über die Konzentration bzw. die Menge an eingesetztem Enzym zugänglich. Durch Auftragung der Ergebnisse nach Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee bzw. Hanes (Cornish-Bowden, 1979) wurden die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) ermittelt.

2.9 Sekundärstoffanalyse

2.9.1 Aufarbeitung von pflanzlichem Gewebe

A. thaliana-Gewebe (Zellkultur und Pflanzenorgane) wurde nach der Ernte direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Fand die Aufarbeitung direkt im Anschluss statt, so wurden geringe Mengen bis 100 mg auf Eis gehalten und frisch eingesetzt.

Homogenisierung von bis zu 2 g gefrorenen Wurzelgewebes erfolgte direkt im Extraktionspuffer in 50 ml Falcon Reaktionsgefäßen mit Hilfe des Ultra Turrax (IKA Werk, Staufen) Mixers. Größere Mengen sowie alle weiteren *A. thaliana*-Organe wurden in unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Kleine Mengen an Gewebe wurden in gefrorenem Zustand mit dem BeadBeater (BioSpec Products, Oklahoma) und Silicabeads (0,5 mm Durchmesser, Firma Roth, Karlsruhe) für 30 sec homogenisiert.

Homogenisiertes Gewebe wurde bei -80°C gelagert.

2.9.2 Extraktion von Sekundärmetaboliten

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Verdünnungen der Lösemittel mit destilliertem Wasser angesetzt. Lösemittel für Waschschrte wurden in technischer Qualität eingesetzt, für die Analyse wurden die Proben aufgenommen in HPLC-Grade Methanol (mit sterilfiltriertem Millipore Wasser auf jeweiligen Prozentsatz eingestellt).

Extraktion löslicher Bestandteile

Alle Extraktionsschritte wurden zweifach durchgeführt, mit einem Verhältnis von 1:10 (w/w) Lösemittel zu Frischgewicht Gewebe. Für die Isolierung löslicher Komponenten des Sekundärstoffwechsels wurde das pulverisierte Gewebe zunächst in 50% Methanol suspendiert, 5 min im Ultraschallbad behandelt, bis eine homogene Suspension erreicht war. Mengen bis 100 mg wurden dabei zunächst im BeadBeater und Silicabeads mit Lösemittel geschüttelt, bis keine Gewebestücke mehr erkennbar waren, anschließend 15 min im Schüttler gemixt. Größere Probenmengen wurden in 50 ml Falcon Reaktionsgefäßen auf dem Überkopfschüttler für 15 min extrahiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende Sediment mit 100% Methanol erneut extrahiert. Die gesammelten methanolischen Überstände wurden unter Vakuum im SpeedVac (Eppendorf), oder bei größeren Mengen bei 30°C im Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 80% Methanol resuspendiert und nach Filtration über lösemittelstabile Glasfaserfilter bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Extraktion zellwandgebundener Bestandteile

Zur Anreicherung von Zellwandmaterial wurde optimiertes ein Protokoll (nach Strack *et al.*, 1988) eingesetzt, das zur Erhöhung der Ausbeute und auf hohe Reproduzierbarkeit hin modifiziert worden war (JW. Tan). Ebenso die Hydrolyse zellwandgebundener Metabolite und die Extraktionsbedingungen wurden für *A. thaliana* optimiert (JW. Tan).

Die unlöslichen, sedimentierten Rückstände der methanolischen Extraktion (siehe 2.9.2, Extraktion löslicher Metabolite) wurden in aufeinanderfolgenden Schritten jeweils zweifach mit einer Reihe von Lösemitteln (Wasser, 0,5% SDS, 1M NaCl, Wasser, Methanol, Aceton, n-Hexan) gewaschen (10:1 (w/w) Lösemittel zu Frischgewicht Gewebe). Hierzu wurde der Rückstand resuspendiert, für 5 min geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der unlösliche Hexan-Rückstand wurde im Exsikkator unter Vakuum getrocknet (1d) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die alkalische Hydrolyse des Zellwandrückstands erfolgte mit 1 M Natronlauge (1 ml NaOH pro 1 mg Zellwandrückstand) bei 80°C über 24 h unter Stickstoffatmosphäre und Lichtabschluss. Der pH der Suspension wurde mit Salzsäure auf 3 eingestellt und der Ansatz dreifach mit gleichem Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Der zur Trockene einrotierte Extrakt wurde mit 80% Methanol resuspendiert und nach Filtration über lösemittelstabile Glasfaserfilter bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Kulturmedium

Lösliche Sekundärmetabolite aus dem Kulturmedium von Flüssig-Wurzelkulturen wurden aus gesammeltem Medium (etwa 40 ml) mittels Festphasenextraktion (SPE-C₁₈ Kartuschen, Supelco, Sigma-Aldrich) isoliert. Hierzu wurde das Medium nach Filtration sukzessive über die Säule gegeben, um die Metabolite zu Binden. Anschließend wurde die Säule zweifach mit je 5 ml Wasser gewaschen und dann mit 1 ml 80% Methanol extrahiert. Das Eluat wurde bis zur Trockene eingeeengt SpeedVac (Eppendorf), in 150 µl 80% Methanol resuspendiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.9.3 Analytische Hochleistungs-dünnschichtchromatographie

Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (HPTLC) gestattet schnelle und reproduzierbare qualitative Untersuchung von löslichen Sekundärmetaboliten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um Unterschiede im Muster der Metabolite verschiedener Nullmutanten zu untersuchen. Im Besonderen ist der biochemische Phänotyp der *fah1*-Mutante (siehe 2.6.5 und detailliert im Ergebnisteil) mittels HPTLC unproblematisch zu überprüfen.

Das angewandte Protokoll ist beschrieben unter Veit und Pauli (1999). Analysiert wurden Extrakte, die wie unter 2.9.2 (Extraktion löslicher Bestandteile) beschrieben hergestellt wurden. Eine modifizierte und verkürzte Variante kam bei der Durchsichtung der F2 Nachkommen von Kreuzungen mit der *fah*-Mutante zum Einsatz. Hierzu wurden 20-50 mg des frischen Gewebes direkt mit 80% Methanol in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen im BeadBeater mit Silicabeads homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand direkt eingesetzt.

Je nach Konzentration wurden zwischen 1-3 µl des Extraktes auf Kieselgel-Silica60 HPTLC Platten (Merck, Darmstadt) sukzessive in 1 µl Aliquots aufgetragen, vor weiterer Beladung und dem Lauf wurde die Platte 5 min bei RT getrocknet. In einer HPTLC-Kammer (DESAGA) wurde die horizontale Auftrennung mit einer mobilen Phase aus Ethylacetat/Wasser/Essigsäure/Ameisensäure (im Volumenverhältnis 100:26:26:12) durchgeführt. Nach Abdampfen des Lösemittels wurde die Platte mit einer 1%igen Lösung von Naturstoffreagenz A (Firma Roth, Karlsruhe) in Methanol und anschließend mit einer 5%igen PEG400-Lösung besprüht. Auf dem Transilluminator wurden die aufgetrennten Sekundärmetabolite unter langwelligem UV-Licht (366 nm) dokumentiert. Sichtbar wurden Kämpferolglykoside in gelb und Quercetinderivate in rot, charakteristisch für Sinapat-Derivate waren hellblaue Banden nahe der Lauffront.

2.9.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Auftrennung der methanolischen Extrakte erfolgte auf einer C-18 Säule (ET250/4 120-5, Macherey-Nagel, Düren), die Detektion wurde mittels Dioden-Array-Detektoren bei einer Standardwellenlänge von 254 nm durchgeführt, der Wellenlängenbereich von 240 bis 400 nm wurde für Quantifizierung und zum

Nachweis weiterer Substanzen ebenfalls aufgezeichnet. Auf folgendem HPLC-System wurden die Extrakte analysiert:
BioTek Kontron, sampler RS232, diode array detector DAD540, system 522, degaser Deagasy DG-1210, Software KromaSystem 2000.

Gradientensysteme

Gradientensystem zur Analyse von

Fluss: 0,5-2 ml/min;

Puffer A: 0,1 % TFA in Millipore-Wasser

Puffer B: Acetonitil (0,1 % TFA)

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	0
3,5	6
13,5	20
20,5	24
21,0	30
33,5	80
34,5	100

3 Ergebnisse

3.1 In silico Analysen

3.1.1 4CLs im Pflanzenreich

Aufgrund ihrer zentralen Stellung im pflanzlichen Stoffwechsel sind die evolutionär sehr alten 4CLs in Landpflanzen höchstwahrscheinlich ubiquitär vertreten.

Über Datenbankrecherchen wurden die Sequenzen aller verfügbaren pflanzlichen, bereits beschriebenen, charakterisierten und somit als 4CL annotierten Proteine gesammelt und in einer lokalen Datenbank zusammengefasst. Weiterhin wurden bakterielle Enzyme, die 4CL-charakteristische Reaktionen katalysieren können, ermittelt und aus *A. thaliana* die nächsten, zu 4CL ähnlichen Verwandten hinzugefügt. Die detaillierte Liste aller Gene mit ihren Zugriffsnummern ist im Anhang wiedergegeben.

3.1.2 Die Familie der *A. thaliana* 4-Cumarat:CoA Ligasen (*At4CLs*)

Die Familie der 4CL-Isoformen in *A. thaliana* wurde im Laufe der Zeit schrittweise um neue Mitglieder erweitert. Zu jeder Erweiterung liegen Publikationen vor, in denen unvorsichtigerweise spekuliert wurde, es handle sich hierbei um eine vollständige und abgeschlossenen Gruppe. Das *A. thaliana*-Genom kann als zu 95% sequenziert betrachtet werden und wurde im Rahmen dieser Arbeit intensiv durchsichtet. Hierbei wurde eine Sequenz identifiziert, die den bekannten 4CLs ähnlich war, sich jedoch nicht vollständig mit ihnen zur Deckung bringen ließ. Die Tatsache, dass der codierende Bereich mit auf der für das *At4CL2*-Gen annotierten Sequenz lag, war offensichtlich Ursache dafür, dass dies bislang unentdeckt geblieben war. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde dieses zunächst "4CL2-ähnliche" Gen durchgehend als *At4CL4* bezeichnet, um Missverständnisse zu vermeiden.

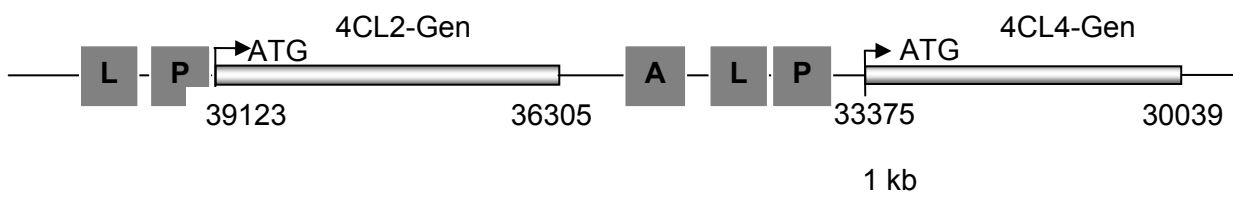


Abbildung 6: Genomische Anordnung von *At4CL2* und *At4CL4*.

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Chromosom III. Die Struktur der Tandemduplikation wurde mit Hilfe des BAC-Klons MXL8 (AB023045, revertierte Orientierung) entwickelt, der sowohl *At4CL2* als auch *At4CL4* trägt. Eine sehr vereinfachte Darstellung mutmaßlicher Elemente im Promotor von *At4CL4* ist ebenfalls abgebildet.

Da dieses *At4CL4* ein mutmaßlich weiteres Mitglied der 4CL-Familie in *A. thaliana* darstellte, war es wichtig, anhand der Informationen die über 4CLs verfügbar waren, zu zeigen,

inwieweit dieses Gen den Sequenz-Kriterien entsprach. Den erste Schritt hierbei stellte eine phylogenetische Analyse dar.

3.1.3 Die Familie der Reis Os4CLs

Neben *A. thaliana* ist Reis (*Oryza sativa*, im Folgenden *O. sativa*) eine weitere Pflanze für die umfangreiche Sequenzinformationen zur Verfügung stehen, da das Reisgenom von mehreren Konsortien zu mindestens 80% sequenziert wurde. Diese Daten ermöglichten es, neben *A. thaliana* einen weiteren Organismus mit mutmaßlich vollständiger 4CL-Genfamilie auf Sequenzebene zu untersuchen. Bislang waren zwei 4CLs in Reis annotiert und unter der Annahme, dass die Familie hier ebenfalls weitere Mitglieder enthält, wurde die vollständig verfügbare Sequenzinformation von Reis, die im Gegensatz zu *A. thaliana* noch in einer Rohform vorliegt, analysiert.

Drei neue Os4CL Sequenzen konnten im Rahmen dieser Arbeit mit der vollständig erzeugten Annotierung als mutmaßliche Reis 4CLs inklusive 1000 bp Promoterregion an GenBank übermittelt werden. Dies umfasste ebenfalls eine Vorhersage der Intron-Exon-Struktur, kodierende Bereiche und die abgeleitete, wahrscheinlichste Proteinsequenz. Die vorläufigen Zugriffsnummern der mutmaßlichen Reis Os4CL3, Os4CL4 und Os4CL5 wurden von der GenBank vergeben. Die Nucleotidsequenzdaten sind in der sogenannten "Third Party Annotation Section" der DDBJ/EMBL/GenBank Datenbanken unter den Zugriffsnummern: "accession numbers TPA: BK000959-BK000961" abrufbar.

Eine weitere, limitierte Durchsichtung des vom Torrey Mesa Research Institute (TMRI, Syngenta) sequenzierten Teils des Reisgenoms (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) wurde mit der Beschränkung auf 100 kb pro Woche gestattet. Die mutmaßlichen Os4CL3-5 wurden einer BLAST-Suche zugrundegelegt und es konnten alle oben genannten Sequenzen hier bestätigt werden. Die Rohsequenzen von zwei weiteren, möglicherweise letzten Kandidaten der 4CL-Familie in Reis wurden heruntergeladen und gegen beide öffentlichen Datenbanken mit beiden Kultivaren verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ähnlichkeit beider Kultivare bei der Familie der 4CLs 97% nicht überschreitet, was auf möglicherweise zahlreiche Kreuzungen der beiden für die Sequenzierung zugrundegelegten Linien zurückzuführen ist. Unterschiedliche Ansätze bei der Sequenzierungsmethode und bei der computergestützten Auswertung der Daten führen ebenso zu Abweichungen der Informationen. Aufgrund dieser Tatsachen wurden keine Informationen des chinesischen Sequenzierungsprojektes mit dem Kultivar *indica* verwendet, da diese Daten nicht ausreichend gegengeprüft werden konnten.

Die genetische Distanz beider Kultivare aufgrund der veröffentlichten Sequenz war somit weitaus höher, als der evolutionäre Abstand vermuten ließe. Die oben erfolgten Annotierungen beruhten ausschließlich auf aus TIGR-Datenbanken isolierten und in TMRI-Datenbanken bestätigten Sequenzen des Kultivars *Oryza sativa* ssp. *japonica* c.v. *Nipponbare* und sind daher nicht auf das Kultivar *indica* übertragbar.

Mit den mutmaßlichen Mitgliedern umfasst die Familie der Reis 4CLs im Kultivar *japonica* 5 Isoformen. Hinweise auf zwei weitere Homologe konnten ebenfalls gefunden, nicht jedoch ausgewertet werden.

3.1.4 Ähnlichkeiten der *At4CLs* und innerhalb der pflanzlichen 4CL-Familie

Wenn Proteine einen gemeinsamen Vorläufer besitzen und sich im Laufe der Evolution voneinander entfernen, so kann die Ähnlichkeit von Sequenzen nicht nur Rückschluss auf die evolutionäre Distanz, sondern auch auf funktionelle Verwandtschaft geben.

Die einfachste und direkt zugängliche Methode, aufgrund von Proteinsequenzen mögliche Vorhersagen zur Verwandtschaft zu stellen, sind globale Alignments der Sequenzen. In der folgenden Tabelle dargestellt sind die prozentualen Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen, bzw. Prozent identischer Positionen, die durch paarweise Vergleiche der dargestellten Sequenzen erhalten wurden.

Tabelle 1: Vergleich von 4-Cumarat:CoA Ligasen aus *A. thaliana* mit Verwandten und einigen ausgewählten Vertretern anderer Organismen.

Die gestrichelten Linien unterteilen die Tabelle in die Familie der *At4CLs*, weiter 4CLs anderer Pflanzen sowie die Gruppe 4CL-Verwandter aus Bakterien und der ähnlichsten Sequenz aus *A. thaliana*.

	<i>At4CL1</i>	<i>At4CL2</i>	<i>At4CL3</i>	<i>At4CL4</i>
<i>At4CL1</i>	--	86 (83)	71 (61)	75 (66)
<i>At4CL2</i>		--	73 (62)	76 (65)
<i>At4CL3</i>			--	68 (58)
<i>At4CL4</i>				--
<i>Gm4CL1</i>	76 (66)	75 (65)	71 (60)	72 (56)
<i>Gm4CL3</i>	73 (63)	74 (63)	80 (74)	67 (57)
<i>Os4CL1</i>	71 (62)	71 (60)	70 (59)	68 (57)
<i>Os4CL2</i>	69 (59)	70 (60)	75 (67)	65 (56)
<i>Sc4CL</i>	54 (45)	53 (45)	53 (43)	56 (46)
<i>At1g20510</i>	51 (41)	49 (38)	51 (40)	49 (38)
<i>AeBZL</i>	35 (26)	36 (26)	36 (28)	34 (26)

Angegeben sind die Häufigkeiten ähnlicher und identischer (in Klammern) Aminosäuren der Proteine in Prozent, ermittelt mit dem *gap* Algorithmus (GCG Programmpaket, Vergleich der Aminosäuren mit der Standard Blosom62-Vergleichsmatrix) über die gesamte Länge der Sequenz. Diese Ähnlichkeitsmatrix wurde durch paarweise Vergleiche aller Kombinationen erstellt.

Sc4CL, bakterielle 4-Cumarat:CoA-Ligase *Streptomyces coelicolor* A3(2) CAB95894; *AeBZL*, bakterielle Benzoat:CoA-Ligase *Azoarcus evansii* CAD21640; *Os4CL* *O. sativa*, *Gm4CL* *G. max*, *At1g20510* nächster Verwandter zu 4-Cumarat:CoA Ligasen, *A. thaliana*;

Innerhalb der *A. thaliana*-4-Cumarat:CoA Ligasen liegen die Isoformen *At4CL1* und *At4CL2* nahe beisammen, mit der größten Distanz zu der Isoform *At4CL3*. *At4CL4* nimmt eine Zwischenposition, mit höchster Ähnlichkeit zu *At4CL2* ein.

Die Werte spiegeln auch im Vergleich mit ausgewählten Organismen bekannte Verwandtschaftsbeziehungen wider. So ist Soja *Gm4CL1* ein Mitglied der Klasse I (Lindermayr et al., 2002) und zeigt höhere Ähnlichkeit (jeweils fett dargestellt) zu den

A. thaliana-Isoformen *At4CL1* und *At4CL2*, während Soja *Gm4CL3* auch aufgrund ihrer Substratspezifität einen typischen Klasse II-Vertreter darstellt und mit der *A. thaliana At4CL3* zusammenfällt. Die Ähnlichkeit der *A. thaliana*-Isoformen zu solchen aus Monokotyledonen ist erwartungsgemäß niedriger, oben gezeigte Verwandtschaften konnten aber im Vergleich mit den Reis-Isoformen bestätigt werden.

Bakterielle Isoformen wie die *S. coelicolor-Sc4CL* zeigen deutlich niedrigere Ähnlichkeiten, sie dürften auch aufgrund des Fehlens eines 4-Cumarat-Stoffwechsels in Bakterien *in vivo* andere Funktionen erfüllen. Das sequenzähnlichste Protein aus *A. thaliana* und eine bakterielle Benzoyl:CoA Ligase weichen noch weiter ab. Der Vergleich mit 29 weiteren pflanzlichen 4-Cumarat:CoA Ligasen (siehe Tabelle 4 im Anhang) zeigt, dass aufgrund der bislang veröffentlichten Sequenzen ein Schwellenwert von 64 (55) Prozent ausreicht, um alle funktionellen 4CL Isoformen eindeutig von sequenzähnlichen, aber nicht funktionellen Verwandten zu trennen. Eine verbesserte Einsicht in die funktionellen Vorhersagen lässt sich durch die evolutionäre Perspektive gewinnen. Weitere Kriterien sind damit phylogenetische Distanzen (Kap. 3.1.5) sowie das Auftreten möglicher *cis*-Elemente in den Promotoren (Kap. 3.1.8).

Tatsächlich legen diese Ergebnisse eine funktionelle Zugehörigkeit der *At4CL4* zu der Familie der 4CLs nahe. Es konnte gezeigt werden, dass paarweise Vergleiche erste Anhaltspunkte zur Verwandtschaft liefern. Aufgrund dieser Erkenntnisse versprach eine phylogenetische Analyse, die alle bekannten 4CLs einschließt, weitergehende Aufklärung evolutionärer Distanzen und funktioneller Verwandtschaften.

3.1.5 Phylogenetische Analysen

Phylogenetische Analysen sind ein wertvolles Werkzeug aus evolutionärer Perspektive zur Verbesserung funktioneller Vorhersagen, die zuvor aufgrund von Ähnlichkeiten der Sequenzen erstellt wurden. Die *in-vivo* Funktion eines Enzyms, das zu einer Gruppe homologer, bereits charakterisierter Enzyme gehört, kann leichter vorhergesagt werden.

Grundlage hierfür war ein lokales, multiples Alignment von 33 bereits funktionell charakterisierten bzw. annotierten 4CLs aus dem Pflanzenreich, anhand dessen anschließend die Berechnungen der phylogenetischen Analyse durchgeführt wurden. Das Alignment ist im Anhang (Seite 166) wiedergegeben, die *A. thaliana 4CL4* wurde als vierundreissigste 4CL aufgenommen, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine Enzymcharakterisierung vorlag.

Klasse II

4-Cumarat:CoA Ligasen,
assoziiert mit Flavonoidbiosynthese

Klasse I

4-Cumarat:CoA Ligasen,
assoziiert mit Synthese von Lignin
und anderen Phenylpropan-Derivaten

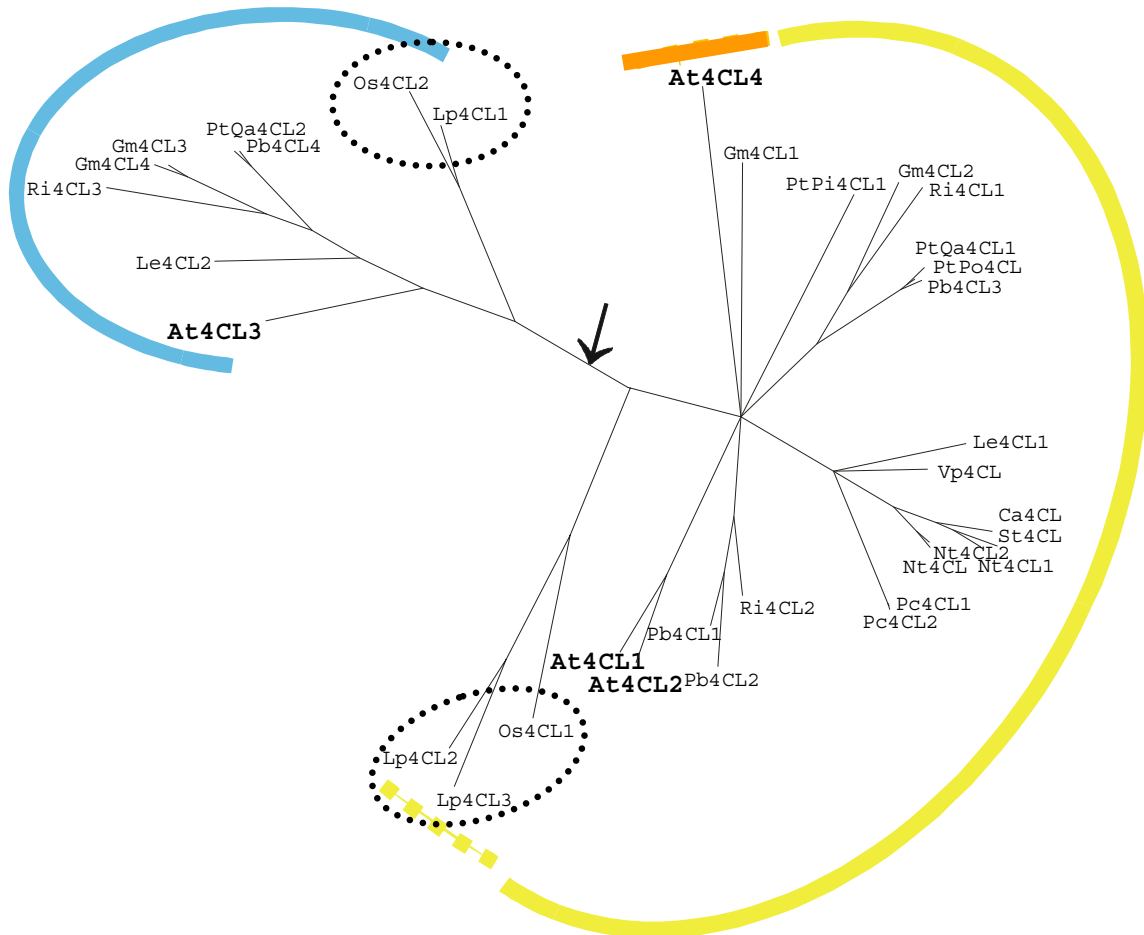


Abbildung 7: Ungewurzelte Darstellung der phylogenetischen Analyse annotierter und charakterisierter 4CLs.

Eine Bootstrap-Analyse der heuristischen Suche (maximum parsimony, TBR, 500 Durchläufe) nach dem optimalen Baum wurde durchgeführt. Signifikante Bootstrap-Werte sind an den Ästen angegeben. Die Länge der Äste ist relativ zu der Distanz. Die mutmaßliche Wurzel des Baums wurde mit einem Pfeil markiert. Vertreter der Klasse I 4CLs sind gelb, bzw. orange für die putativen Mitglieder, Klasse II 4CLs sind blau markiert. Die Gruppen der 4CLs monokotyledoner Pflanzen sind durch die Ellipsen hervorgehoben.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, lassen sich aus der phylogenetischen Analyse einige grundsätzliche Zusammenhänge ablesen. Wie bereits zuvor beschrieben (Ehltling et al., 1999) existieren zwei Klassen von 4CLs, die jeweils phylogenetisch zusammen gruppieren. Dies ließ sich in der ungewurzelten Darstellung gut zeigen, links wurden die 4CLs Klasse II, rechts die der Klasse I zusammen angeordnet. Interessanterweise konnte mit dieser Darstellung ebenfalls eine getrennte Gruppierung der Mono- und Dikotyledonen Pflanzen gezeigt werden, in jeder Art sind beide Klassen von 4CLs vertreten. Nimmt man für die 4CLs eine vergleichbare Mutationsrate an, wie es das Parsimony-Modell vorsieht, dann

entsprechen die Astlängen in dieser Darstellung der relativen Distanz. Anhand dieser Distanz wurde ein Mittelpunkt festgelegt, eine sogenannte Wurzel des Baums, an deren Position der virtuelle evolutionäre Ursprung, also der gemeinsame Vorfahre, die Ur-4CL liegt. Mit Hilfe dieser Position lässt sich demonstrieren, dass sich die beiden funktionell unterschiedlichen Klassen der 4CLs gebildet haben müssen, bevor die Evolution des Pflanzenreichs an die Gabelung zu Mono- und Dikotyledonen gelangt war.

Eine Randgruppe der Klasse I stellt offenbar die *A. thaliana* At4CL4 und die Soja *Gm4CL1* dar, dies lässt eine mögliche funktionelle Sonderstellung vermuten. Anhand der Einordnung in den Ast der Klasse I wäre für die At4CL4 eine Funktion innerhalb der Synthese von Monolignolvorstufen oder anderen phenolischen Verbindungen zu vermuten.

Dennoch können die dargestellten 4CLs alle als Orthologe bezeichnet werden, da ein monophyletischer Ursprung und eine grundsätzlich erhaltene Funktion vorliegen.

Klasse I 4-Cumarat:CoA Ligasen, assoziiert mit der Synthese von Lignin und anderen Phenylpropan-Derivaten

Klasse II 4-Cumarat:CoA Ligasen, assoziiert mit der Synthese von Flavonoid-Vorläufern

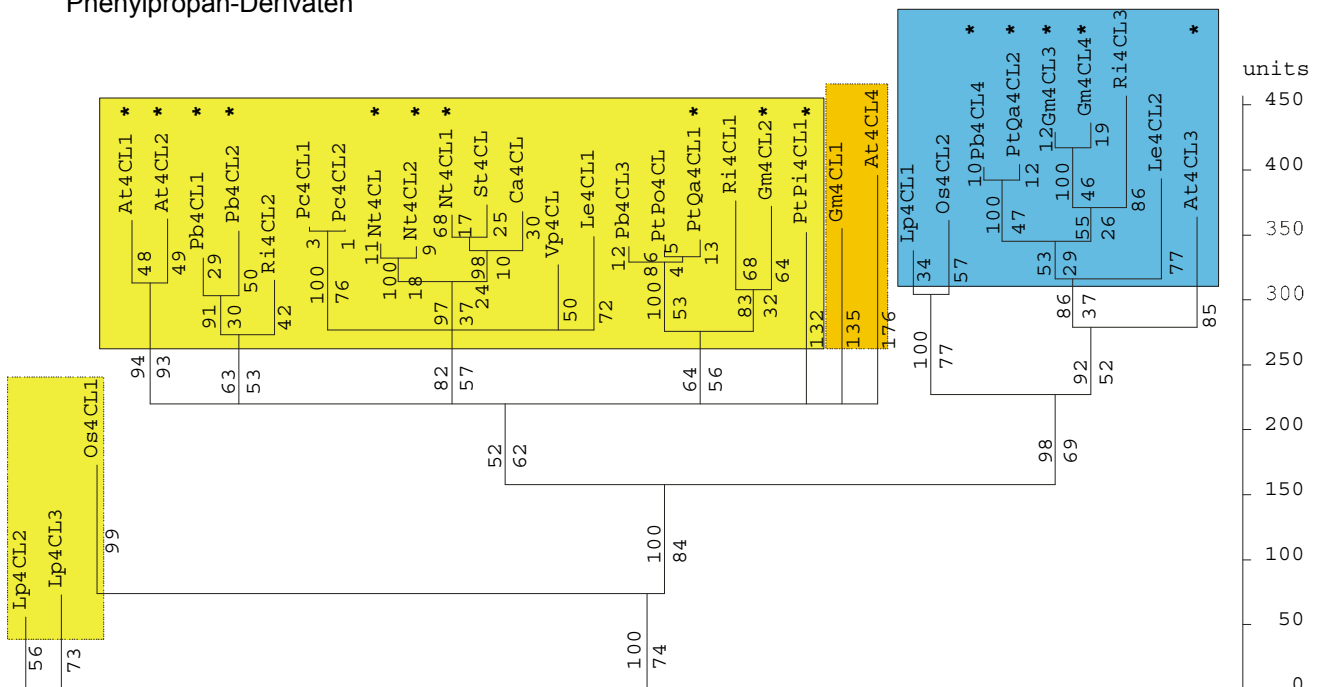


Abbildung 8: Zeitaufgelöste gewurzelte Baumdarstellung der phylogenetischen Analyse annotierter und charakterisierter 4CLs.

Als Wurzel des Baums wurde die Weidelgras *Lp4CL2* (*L. perenne*) gewählt. Eine Bootstrap-Analyse der heuristischen Suche (maximum parsimony, TBR, 500 Durchläufe) nach dem optimalen Baum wurde durchgeführt. Signifikante Bootstrap-Werte sind oberhalb der Äste angegeben, Distanzwerte unterhalb. Vertreter der Klasse I 4CLs sind gelb, bzw. orange für die mutmaßlichen Mitglieder, Klasse II 4CLs sind blau hinterlegt. Markiert mit einem Stern sind 4CLs, deren biochemische bzw. molekularbiologische Eigenschaften die Zugehörigkeit in der Gruppe untermauern.

Abbildung 8 ist die präzisere Darstellung der phylogenetischen Resultate, da mit der Einbeziehung der Distanzwerte, die nach dem Modell relativ zur Zeit sind, Abstände exakt wiedergegeben werden. Die grundsätzliche Topologie ist identisch. Da die durchgeführte Analyse mit dem heuristischen Algorithmus (maximum parsimony, TBR) nicht zwingend den besten Baum ermittelt, wurde die Analyse mit einem reduzierten Satz an 4CLs, mit für jede Klasse repräsentativen Mitgliedern und dem sogenannten Branch-and-Bound Algorithmus wiederholt. Das Ergebnis ist im Anhang in den Abbildungen 43 und 44 wiedergegeben, da hieraus keine neuen Erkenntnisse gewonnen wurden, sondern bereits dargestellte Informationen untermauert wurden. Die Topologie des dort abgebildeten Baums deckt sich mit dem in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellten Ergebnis.

Eine weitere Analyse wurde durchgeführt, in der zusätzlich zu den oben angeführten, bekannten und charakterisierten 4CLs sieben weitere *A. thaliana* Sequenzen hinzugefügt wurden, die die nächsten Verwandten der *At4CL1* bis *At4CL4* darstellten. In der ungewurzelten Darstellung ließ sich klar die Entfernung der 4CL-ähnlichen zu funktionellen 4CLs und der *At4CL4* erkennen. Möglicherweise liegt ein monophyletischer Ursprung vor, funktionelle Verwandtschaft liegt aber eher im Reaktionsmechanismus, als der Substratspezifität. Mechanistisch ähnlich arbeitet die Firefly-Luziferase, ebenfalls ein ATP-umsetzendes Enzym. In der phylogenetischen Darstellung ist sie noch weiter von den 4CLs entfernt, vergleichbar mit Enzymen wie der bakteriellen "4-Cumarat:CoA Ligase" aus *S. coelicolor*, der bakteriellen Benzoat:CoA Ligase aus *A. Evansii* oder auch der *A. thaliana* Hydroxyzimtsäure:Glucosyltransferase *AtSGT1* (nur in Tabelle 1 angegeben, nicht jedoch grafisch dargestellt).

Ebenfalls nicht dargestellt ist die Einordnung der drei neuen putativen Reis-4CLs *Os4CL3* bis *Os4CL5*, die alle in der Klasse I, monokotyledoner 4CLs, nahe bei dem Reisvertreter *Os4CL1* lagen.

Nachdem sich damit die Hinweise auf Funktionalität der *At4CL4* verdichten, ist der nächste Schritt der Analyse eine Einordnung in den genomischen Kontext, der in *A. thaliana* durch vollständige Kartierung des Genoms verfügbar ist.

3.1.6 Genomstrukturanalyse in *A. thaliana*

Wenn die Familie der 4CL-Orthologen, wie in den phylogenetischen Analysen gezeigt, evolutionär sehr früh bereits in Form der zwei Klassen vorlag, dann kann die Entstehung der *At4CL4* möglicherweise evolutionär den Klasse I 4CLs, *At4CL1* und *At4CL2*, zugeordnet werden. Da hier bereits in der Entwicklung eine Differenzierung der Funktion stattfand, handelt es sich bei den *At4CL1*, *At4CL2* und *At4CL3* um Paraloge. Ob dies auch für *At4CL4* gilt, muss noch gezeigt werden.

Genfamilien entstehen durch Duplikationen, entweder Segmentduplikationen ganzer Bereiche oder Tandemduplikationen einzelner, kleinerer Regionen. Wenn die Klasse I 4CLs in *A. thaliana* einen gemeinsamen Ursprung haben und sich erst nach der evolutionären Abspaltung der Spezies *A. thaliana* durch Duplikation entwickelten, dann kann dies womöglich durch die existierende physikalische Kartierung des Genoms nachgewiesen werden.

Die folgende Darstellung ist orientiert an den Informationen der MIPS *A. thaliana* Genome Database (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>). Die physikalischen Positionen der

At4CLs ergaben sich aus der vollständigen Kartierung des Genoms und wurden anhand bekannter Marker zugeordnet.

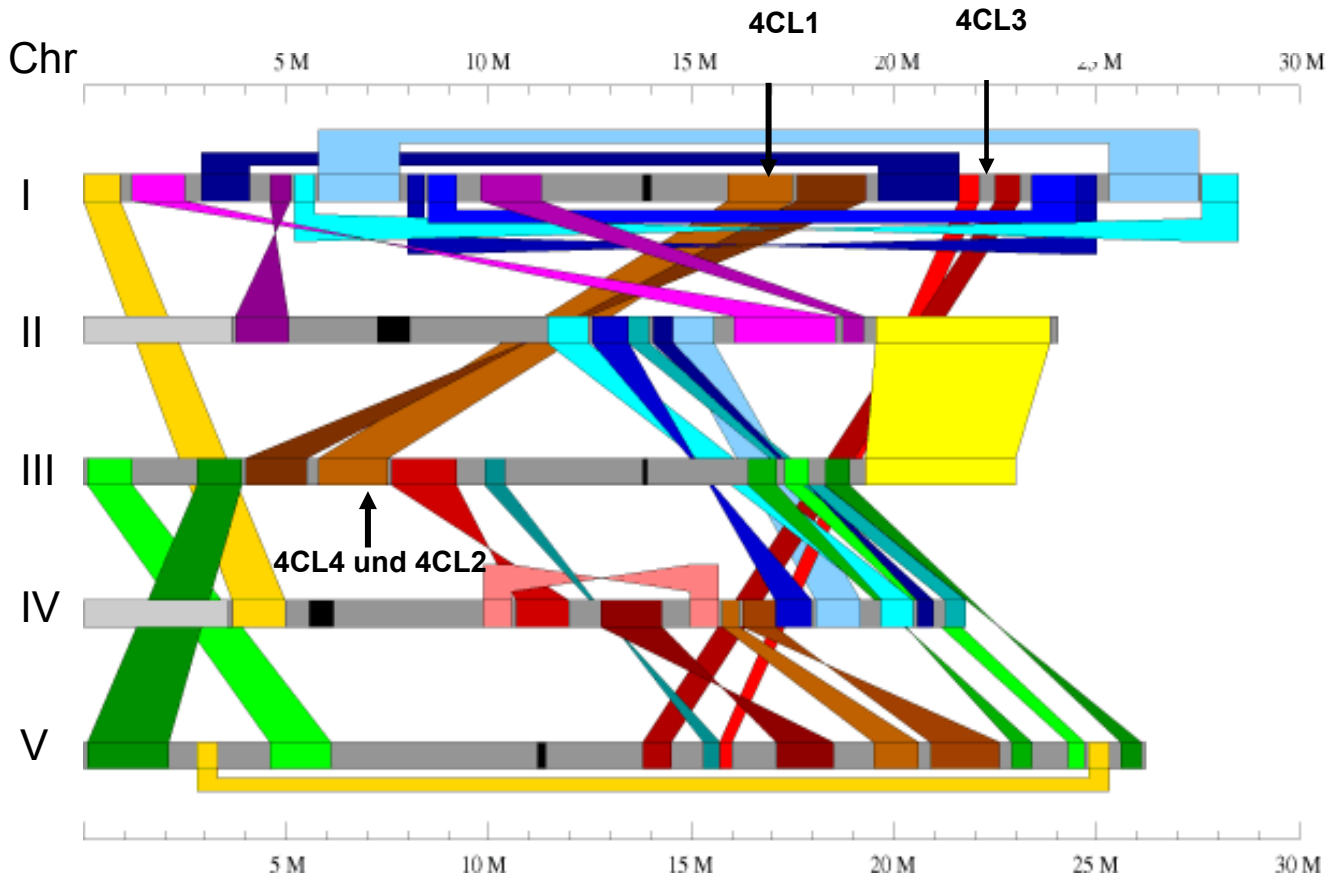


Abbildung 9: Segmentduplikationen im *A. thaliana* Genom. Die grauen horizontalen Balken repräsentieren die 5 *A. thaliana*-Chromosomen.

Duplikationen sind durch farbige Blöcke dargestellt, die durch Bänder mit den ähnlichen Regionen verbunden sind. Gedrehte Bänder zeigen revertierte Orientierung des passenden Segments. Centromeren sind durch schwarze Balken dargestellt, der Maßstab ist in Megabasen angegeben. Die physikalischen Positionen der *At4CL1*, *At4CL2* und *At4CL4* innerhalb der duplizierten Region von Chromosom 1 und 3 sind schwarz, die Position der *At4CL3* ohne passende duplizierte Bereiche ist ebenfalls dargestellt.

At4CL1 und die in Tandem-Orientierung angeordneten *At4CL2* und *At4CL4* liegen auf dem einzigen großen Segment (in hellbraun unterlegt), das auf Chromosom I und Chromosom III dupliziert wurde. *At4CL3* ist wie erwartet nicht mit den Klasse I *At4CLs* verbunden und besitzt auch auf keinem weiteren Chromosom Segment-, Region- oder Einzelduplikationen. Da in der Nachbarschaft der *At4CL1* keine weiteren Regionen mit Ähnlichkeit zu 4CLs gefunden wurden und der hellbraun hervorgehobene Bereich ebenfalls keine weiteren Duplikation unterlag, ist es möglich, dass es sich hierbei um eine vollständig abgeschlossene Klasse, und mit der singulären *At4CL3* sogar um eine vollständige Familie handelt.

Die weitere Untersuchung des Nahbereichs der oben dargestellten Segment-Duplikation sollte helfen, mit zusätzlichen Informationen die Entstehung der *At4CLs*, speziell der Klasse I, aufzuschlüsseln. Ein Vergleich der genaueren Umgebung der Tandem-Duplikation auf Chromosom III mit dem entsprechenden Bereich ohne Tandemduplikation auf Chromosom I könnte hier Licht in die Entwicklungsgeschichte der *At4CLs* bringen. Abbildung 10 zeigt die Vergleich der Nahbereichs der Regionen und der darin enthaltenen Gene, die jeweils die *At4CLs* auf den Chromosomen I und III flankieren.

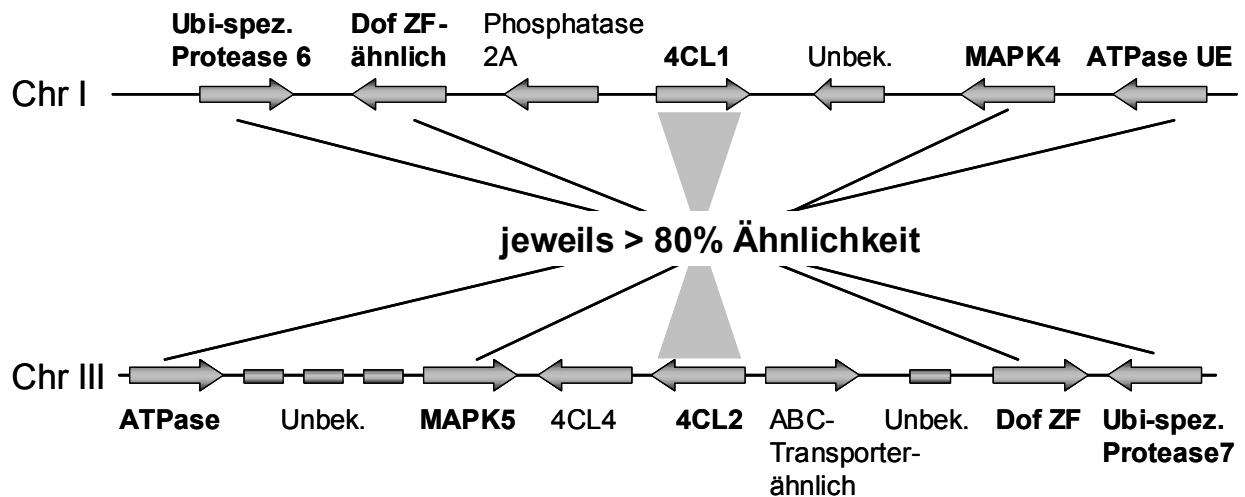


Abbildung 10: Ausschnitte der durch eine Segment-Duplikation erzeugten *At4CL1* und *At4CL2/At4CL4* tragenden chromosomalen Bereiche.

Dargestellt sind Ausschnitte von Chromosom I und III, zentral um *At4CL1* und *At4CL2* angeordnet. Mit symbolischen Pfeilen wurde die Anordnung der Gene innerhalb der Bereiche wiedergegeben. In dieser Reihenfolge entsprechen die symbolischen Bezeichnungen den Annotierungen der Gen-Datenbank für Chromosom I, At1g51710 bis At1g51650, und Chromosom III, At3g21180 bis At3g21280. Nicht annotierte Gene wurden durch BLAST-Suchläufe identifiziert. Fett hervorgehoben sind duplizierte Gen-Paare, die durch Linien verknüpft wurden. Gene ohne identifizierte Partner sind ebenfalls abgebildet sowie Gene unbekannter Funktion. Die Abbildung zeigt Abstände nicht maßstabsgetreu.

At4CL1 und *At4CL2* werden von weiteren homologen Gen-Paaren flankiert, die ebenfalls durch die Segment-Duplikation entstanden sind. Die Paare sind alle zueinander mehr als 80% ähnlich sowie in der gleichen relativen Orientierung angeordnet. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, konnte kein *At4CL4*-Pendant auf Chromosom I identifiziert werden, obwohl die Bereiche zwischen den Paaren *At4CL1/At4CL2* und *MAPK4/MAPK5* (*At4CL4* und das unbekannte Protein) fast identische Größe aufwiesen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die *A. thaliana* Klasse I *At4CLs* höchstwahrscheinlich aus einer Segmentduplikation (*At4CL1* und *At4CL2/At4CL4*) zwischen Chromosom I und III und wie bereits zuvor gezeigt einer lokalen Tandemduplikation (*At4CL2* und *At4CL4*) hervorgingen.

Dieses Resultat sollte sich durch Untersuchung der Genstrukturen bestätigen lassen, da sich auf dieser Ebene direkt die evolutionäre Entwicklung und Spezifizierung der Enzyme auswirkt.

3.1.7 Genstrukturanalyse der *At4CLs*

Wenn die Annahme korrekt ist, dass *At4CL4* als Mitglied der *At4CL*-Genfamilie das Resultat einer Duplikation ist, dann sollte die Genstruktur die evolutionäre Entwicklung widerspiegeln, *At4CL4* sollte also den anderen Mitgliedern ähnlich sein. Anhand der bekannten Intron-Exon Grenzen der Gene *At4CL1* bis *At4CL3* sowie der vorhergesagten Struktur der *At4CL4* wurde ein Vergleich der vier Gene durchgeführt, der in der folgenden Abbildung grafisch wiedergegeben ist.

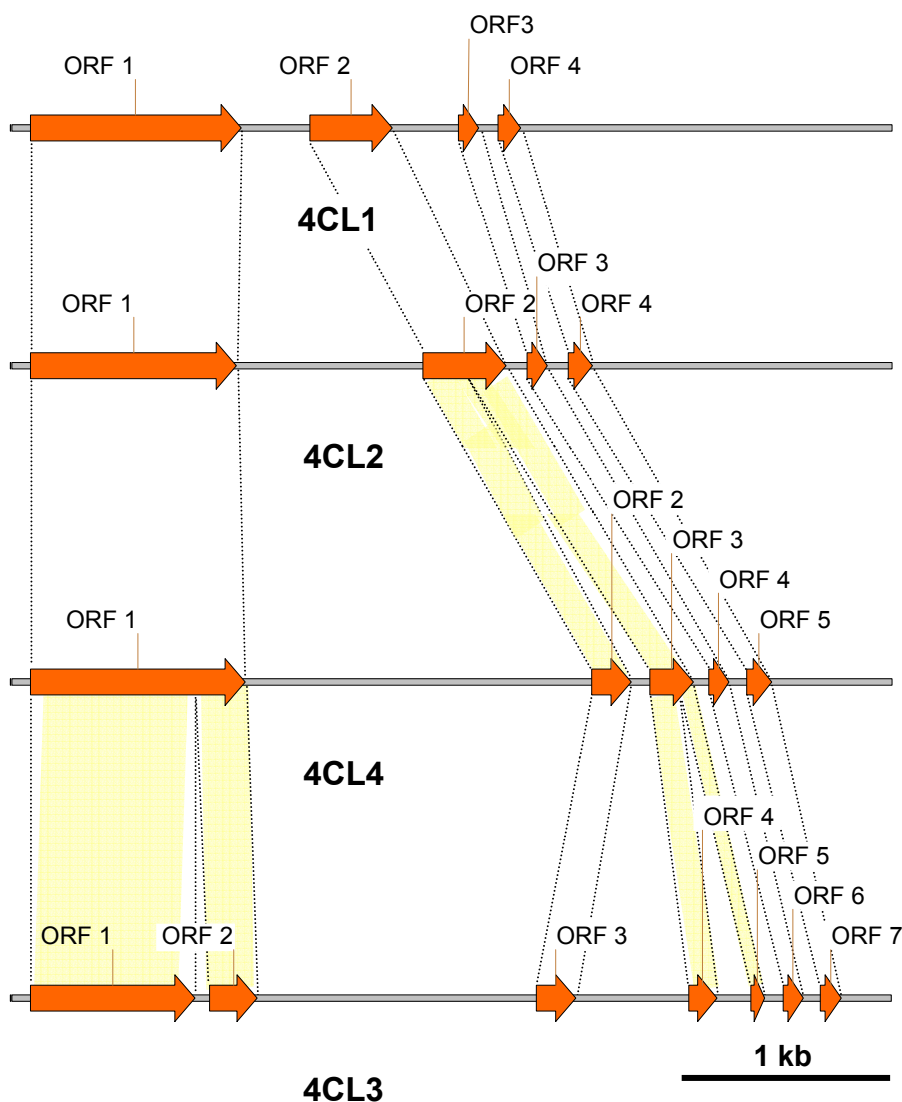


Abbildung 11: Organisation der Genstruktur der *At4CL*-Familie. Dargestellt sind die Gene in ansteigender Komplexität ihrer Intron-Exon Strukturen.

Alle Exonbereiche konnten innerhalb der Familie aufgrund ihrer Sequenz und Grenzen zum nächsten Intron zugeordnet werden und sind durch Linien verbunden. Drei Aufspaltungen

der Exons von *At4CL2* nach *At4CL4* und von *At4CL4* nach *At4CL3* wurden durch farbige Balken hervorgehoben. (ORF, *open reading frame*)

Die Genstruktur der *A. thaliana* 4CLs ist sehr ähnlich organisiert und zeigt eine lineare Entwicklung mit steigender Komplexität in der Reihe von *At4CL1*, *At4CL2* und *At4CL4*. Intronbereiche wurden vergrößert und das Exon 2 von *At4CL2* spaltete sich auf in die Exons 2 und 3 von *At4CL4*. Die Genstruktur von *At4CL3* liegt in der Komplexität noch eine Stufe darüber, zwei Aufspaltungen und die Verschiebung des dritten Exons stellen einen großen Schritt dar, für den kein Bindeglied gefunden wurde.

Dieses Resultat konnte somit erneut die Tatsache untermauern, dass *At4CL4* ein Mitglied der *At4CL*-Familie darstellt, ebenso wie die Sonderstellung der *At4CL3*. *At4CL1* und *At4CL2* sind somit direkte Ergebnisse einer Duplikation, *At4CL4* ist über die Tandemduplikation verknüpft mit *At4CL2*.

3.1.8 Promotoranalyse der *At4CLs*

Die Entwicklung und Spezifizierung von Paralogen findet zu einem beachtlichen Teil über Differenzierung der transkriptionellen Regulierung statt. Dennoch weisen Promotoren von Genen, die einem gemeinsamen Stoffwechselweg angehören, oft vergleichbare Grundmerkmale auf. Daher wurde der Promotor von *At4CL4* auf das Vorhandensein von Elementen wie den P-, A- und L-Boxen untersucht, die charakteristisch für Phenylpropanstoffwechsel-Gene sind, und die bereits für die anderen 4CLs und einige weitere Phenylpropanstoffwechsel-Gene beschrieben wurden. Des Weiteren sollten mögliche Unterschiede oder spezielle Charakteristika identifiziert werden, die Hinweise auf eine phylogenetische Sonderstellung der *At4CL4* gegenüber den anderen 4CLs geben.

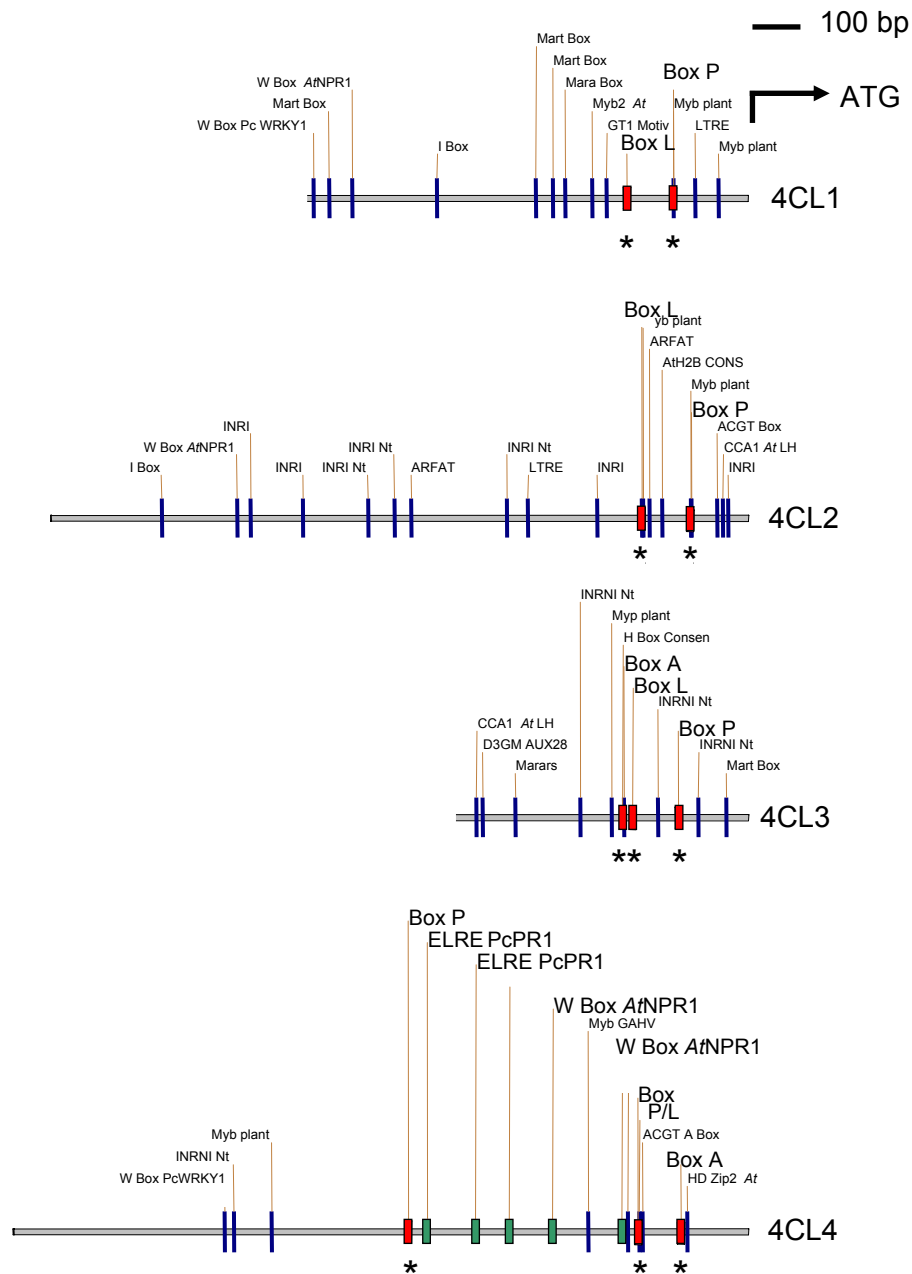


Abbildung 12: Promotorstruktur der At4CLs.

Dargestellt sind die in der Genbank jeweils annotierten Bereiche einschließlich der ermittelten Positionen mutmaßlicher *cis*-aktiver Elemente. Die Boxen P, A und L (rot unterlegt und mit einem Stern markiert) für At4CL1-3 wurden früheren Annotierungen entnommen, die Positionen in At4CL4 wurden anhand des in Kapitel 3.1.9 beschriebenen Algorithmus ermittelt. Manuelle Durchsichtung der Promotorbereiche ergab die mutmaßlichen W-Boxen (bis -1000 bp grün unterlegt). Weiterhin wurden die Sequenzen auf putative Erkennungssequenzen mittels der PLACE Datenbank analysiert (blau markiert). Eine detaillierte Auflistung der Elemente, Konsensussequenzen und Positionen ist im Anhang in Tabelle 5 wiedergegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass der Promoter von At4CL4 die für Phenylpropanstoffwechsel-Gene charakteristischen Boxen enthielt. Die Entwicklung des hierfür eingesetzten Algorithmus wird im nächsten Abschnitt beschrieben. Das Muster der

Verteilung entspricht jedoch nicht dem der anderen *At4CLs*, so liegt eine mutmaßliche P-Box weiter oberhalb des ATG, als bei den anderen Genen beschrieben, dafür existiert eine Region auf der zu erwartenden Höhe, die eine mutmaßliche L-Box enthält. Möglicherweise überschneiden sich hier aber die zwei Elemente, deren Konsensus eine absolute Unterscheidung nicht zulässt.

In Bezug auf weitere Elemente nimmt der Promotor der *At4CL4* innerhalb der *At4CLs* eine Sonderstellung ein, denn für keine der *At4CLs* wurde bislang das Auftreten von W-Boxen beschrieben. Während in der als relevant angesehenen Region bis 800 bp in *At4CL4* direkt zwei dieser Elemente zu finden waren (dargestellt in Tabelle 5 im Anhang) konnten in dieser Region der Promotoren der anderen 4CLs keine W-Boxen nachgewiesen werden, obwohl ihr Auftreten statistisch wesentlich häufiger sein sollte.

Aufgrund dieser erstaunlichen Tatsache wurden weitere 26 Promotoren von Phenylpropanstoffwechsel-Genen verschiedenster Organismen untersucht. Es zeigte sich, dass das W-Box Motiv in dieser Gruppe von Genen sehr stark unterrepräsentiert ist. Die Tabelle mit allen Genen, Zugriffsnummern und den wenigen relativen Positionen bis 960 bp stromaufwärts des ATG-Startkodons von putativen W-Boxen innerhalb der Promotoren von Phenylpropanstoffwechsel-Genen ist im Anhang (dargestellt in Tabelle 6) wiedergegeben.

3.1.9 Entwicklung einer Konsensusmatrix zur Identifikation und Evaluierung mutmaßlich *cis*-regulatorischer Elemente P, A, und L in Promotoren von Phenylpropanstoffwechsel-Genen

In Promotoren von Phenylpropanstoffwechsel-Genen verschiedenster Organismen konnten sequenzähnliche Motive identifiziert und z.T. funktionell beschrieben werden. Durch "*in-vivo* DNA *footprint*"-Analysen wurden drei kurze Nukleotidsequenzen als mögliche *cis*-aktive Elemente identifiziert, wovon zwei licht- bzw. drei elicitorabhängig induzierbar waren (R.Lois, 1989). Die Sequenzhomologie erleichterte die Identifizierung weiterer mutmaßlicher Elemente. Es konnte gezeigt werden, dass in zahlreichen PAL und 4CL Genen die als Boxen P, A und L bezeichneten Elemente an ähnlichen Positionen innerhalb des Promotors auftreten (Logemann et al., 1995).

Durch die große Anzahl beschriebener Elemente konnte eine Analyse der Nukleotidverteilung über den Bereich der P-, A- und L-Elemente durchgeführt werden. Die so erhaltene Häufigkeitsmatrix erlaubt im Vergleich mit dem bislang beschriebenen Konsensus die präzisere Beurteilung eines mutmaßlichen Elements (grafisch Dargestellt in Abbildung 14). Zudem eignet sich die Matrix für rechnergestützte Analysen großer Datensätze wie dem vorliegenden vollständigen *A. thaliana*-Genom.

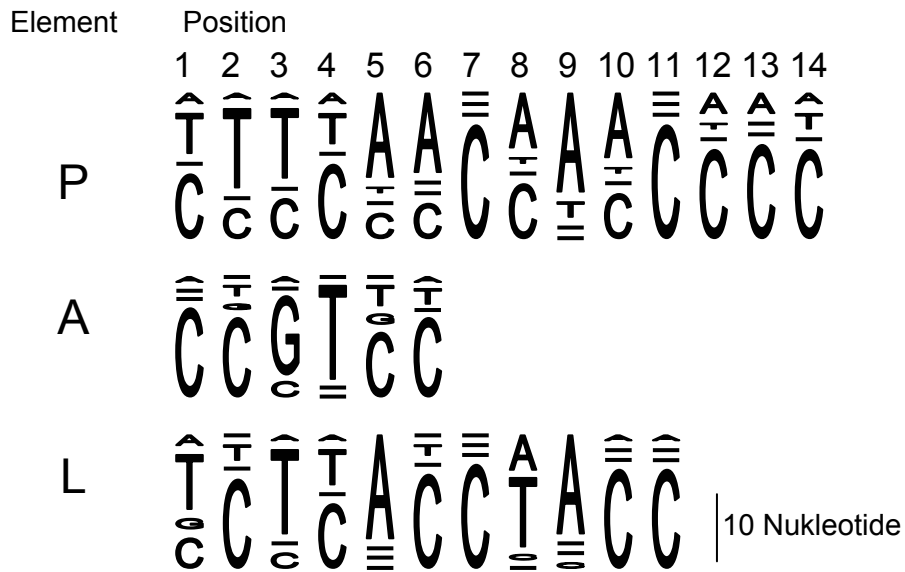


Abbildung 13: Matrixlogos der Boxen P, A und L zur Darstellung des Konsensus und dessen Qualität.

Dargestellt sind absolute Häufigkeiten der einzelnen Nukleotide an jeder Position in den Boxen P, A und L durch die Größe der Nukleotid-Symbole. Ein Balken dokumentiert das Fehlen des Nukleotids an dieser Stelle.

Zur Kontrolle der Matrix wurden die bekannten *At4CL* Elemente bewertet, die nicht zur Entwicklung der Matrix verwendet wurden. Zusätzlich wurden eine zufällige Sequenz ähnlichen Nukleotidgehalts und eine revertierte, komplementäre Sequenz eines Elements getestet.

Im Anschluss wurde der vollständige Promotor von *At4CL4* Position für Position bewertet, um mögliche Elemente zu identifizieren.

In der folgenden Übersicht sind bereits beschriebene Elemente aus *A. thaliana* 4CL-Promotoren (Ehltling et al., 1999) mutmaßlichen identifizierten Elementen des *A. thaliana At4CL4* Promotors gegenübergestellt:

Promoter	Box P	Position	Wert
<i>At4CL1</i>	T T T T C A C C A A C C C C	-161	0.65
<i>At4CL2</i>	A T T T C A C C A A C C A C	-126	0.59
<i>At4CL3</i>	C T T T C A T C A C C A C C	-151	0.54
<i>At4CL4</i>	C A C T C A C C A A C T A C	-233	0.50
<i>At4CL4</i>	T C C T A C C A A A C A A A	-734	0.47
Random	A A T A A T T G C C T T A A	----	0.16
<i>rk4CL1</i>	G G G G T T G G T G A A A A	-161	0.01

	Box A	Position	Wert
<i>At4CL3</i>	C C G T T C	-274	0.78
<i>At4CL4</i>	T C G T T C	-136	0.62
<i>At4CL4</i>	G C C T T C	-140	0.51
<i>At4CL4</i>	C C T T T C	-476	0.64
<i>At4CL4</i>	C A G T T C	-870	0.64
<i>At4CL4</i>	C C G T A T	-1321	0.63
<i>At4CL4</i>	C C G T T C	-1423	0.78

	Box	L	Position	Wert
At4CL1	G C T T A C C A A A C		-260	0.66
At4CL2	G C T C A C C A A C C		-234	0.77
At4CL3	C T C T A C C T A C C		-249	0.67
At4CL4	C C A A A C G T A C C		-110	0.46
At4CL4	A A C T A C G T A G C		-226	0.61
At4CL4	T C C T A C C A A A C		-734	0.64

Die Positionen der mutmaßlichen Elemente sind in Abbildung 12 grafisch dargestellt. Die Elemente P und L können z.T. überlappen, der Konsensus ist nicht absolut restriktiv in der Unterscheidung. Ebenso ist der Konsensus des Elements A relativ weich definiert, daher traten im Promotor von *At4CL4* direkt mehrere mutmaßliche Elemente dieser Art auf, sie sind mit einem Fragezeichen versehen.

3.1.10 W-Boxen in *At4CL4*

Die im Promotor des *At4CL4* identifizierten W-Boxen stellen eine Ausnahmeerscheinung innerhalb der Gruppe von Phenylpropanstoffwechsel-Genen dar. Aus diesem Grund kann eine mögliche Funktion dieser Elemente erste Hinweise auf die Expressions-Regulation geben.

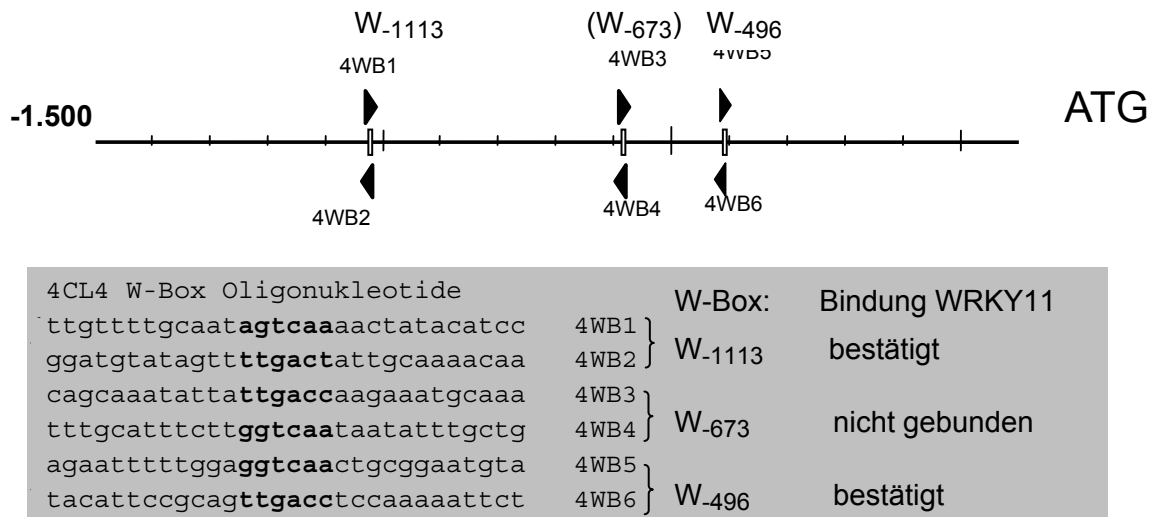


Abbildung 14: Position mutmaßlicher W-Boxen im *At4CL4* Promotor.

In der Promotorregion des *At4CL4*-Gens bis -1.500 bp wurden drei mögliche W-Boxen identifiziert, die als putative WRKY-Bindestellen bei der Transkriptionsregulation agieren könnten. Die Positionen relativ zum ATG-Startcodon wurden als Index angefügt, die W-Boxen wurden in den Sequenzen hervorgehoben.

Durch *in-vitro* WRKY-Binde-Studien konnten für die Oligonukleotidduplexe, die die Boxen *W*₋₁₁₁₃ und *W*₋₄₉₆ enthielten eine Bindung zu WRKY11 gezeigt werden (I. Ciolkowski, pers. Mitteilung, dargestellt in Abbildung 14). Da dieses Projekt Bestandteil der Dissertation von I. Ciolkowski ist, und dort ausführlich behandelt wird, wurde im Weiteren nicht auf Details eingegangen.

3.2 In vitro Analysen

3.2.1 At4CL4 Isolierung

Das Vorhandensein einer genomischen Sequenz ist weder Indiz für die Expression des Gens noch für eine Funktion des Proteins. Daher wurden die *A. thaliana* Datenbanken auf Einträge von EST-Sequenzen durchsichtet. Zu diesem Zeitpunkt wurden für die bereits bekannten At4CLs 5 EST-Klone für At4CL1, 3 EST-Klone für At4CL2, 4 EST-Klone für At4CL3 und keiner für At4CL4 identifiziert. Erst in der letzten Aktualisierung der TIGR-Datenbank (Version 9.0, Release Date - September 19, 2002) konnte ein einzelner EST-Klon identifiziert werden.

Entgegen der ersten Annahme, es könnte sich hierbei um ein nicht exprimiertes Pseudogen handeln, deutete dieses neue Ergebnis auf ein niedriges Expressionsniveau hin, da Sequenzen, gewonnen von cDNAs verschiedenster Gewebe, Grundlage der EST-Datenbanken sind. Ebenso könnte es einen Hinweis darstellen auf extrem spezifische Transkription in Geweben oder unter Bedingungen, die bislang nicht in den Datenbanken repräsentiert waren.

Aus der genomischen Sequenz wurde die mutmaßliche cDNA abgeleitet, hierfür wurden Oligonukleotide generiert. Mit RT-PCR wurde versucht den Beweis zu erbringen, ob und inwieweit At4CL4 transkribiert wird. Mit einer geschachtelten, nachgeschalteten PCR konnten spezifische Produkte weiter amplifiziert werden. Die Reaktion wurde ausgehend von cDNA, isoliert aus elicitorbehandelter *A. thaliana* Zellkultur (freundlicherweise von A. Heise zur Verfügung gestellt) gestartet. In einer parallelen Reaktion aus unbehandelter Zellkultur konnte das Transkript zwar nachgewiesen werden, das Expressionsniveau erschien aber im Vergleich zu der elicitorbehandelten Probe deutlich niedriger. Somit war der Beweis erbracht, dass At4CL4 in *A. thaliana* exprimiert wird, und es stellte sich die Frage nach der Funktionalität des Proteins. Dies sollte über heterologe Expression, Aufreinigung und Funktionstest des *A. thaliana* Proteins geklärt werden.

3.2.2 Heterologe Expression von At4CL4 mit dem pQE-70 System

Nach Amplifikation und Subklonierung wurde das Fragment mit der vollständigen kodierenden Sequenz von At4CL4 in den pQE-70 Vektor ligiert. Mit Hilfe von PCR und Restriktionsendonuklease-Behandlungen konnten mutmaßlich positive Klone identifiziert werden. Nach Transformation und Induktion der heterologen At4CL4-Expression im Expressionsstamm wurden Proteine des Rohextraktes durch ein SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mittels Bio-Coomassie gefärbt. In 6 unabhängigen Proben konnte im Gegensatz zu einer At4CL2-pQE-70 Kontrolle keinerlei Akkumulation von Proteinen in den rekombinanten Klonen beobachtet werden (nicht gezeigt).

Zur Durchsichtung einer größeren Anzahl rekombinanter Klone wurde ein schneller Test auf Enzymaktivität eingesetzt, mittels dessen die Kombination mehrerer Klone auf Aktivität mit verschiedenen Substraten parallel analysiert werden konnte.

Insgesamt wurden 16 verschiedene Klone auf enzymatische Aktivität gegenüber Zimtsäurederivaten getestet. Es konnte gezeigt werden, dass einige der Klone deutlich die für 4CLs charakteristische Reaktion katalysieren (Abbildung 15). Im Vergleich zu der Kontrolle lag aber eine wesentlich langsamere Umsetzung vor, die Färbungen erreichten erst

nach ca. 20 min deutliche Gelbfärbung, die Umsetzung des Kontrollenzym war bereits nach 2-3 min abgeschlossen. Als Kontroll-Enzym wurde eine modifizierte *At4CL2* eingesetzt, die in Hinsicht auf die Substratspezifität breiter aktiv war, als die ursprüngliche *At4CL2* (LP3, von H. P. Stuibler freundlicherweise zur Verfügung gestellt).

Deutliche Unterschiede ergaben sich auch in der Substratspezifität zu bekannten *A. thaliana* 4CLs sowie zu der als Kontrolle eingesetzten modifizierten *At4CL2*. Auffallend war die hier erstmals gezeigte enzymatische Umsetzung von Sinapinsäure zu erkennen (Abbildung 15).

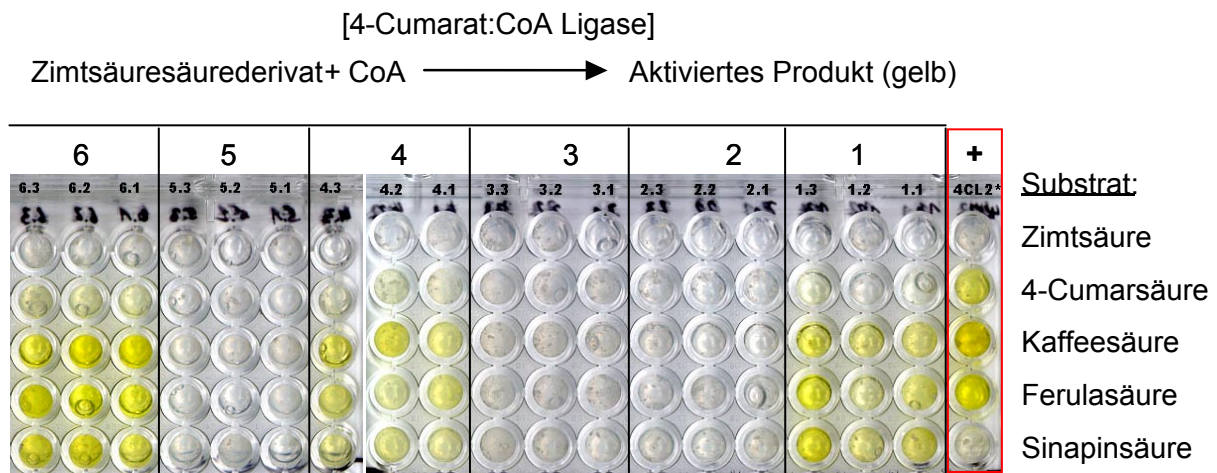


Abbildung 15: Multititerplatten-Test auf 4CL-Aktivität mit Zimtsäure-Derivaten als Substrat.

Die Umsetzung von Zimtsäure-Derivaten mit CoA, katalysiert von *At4CL4*-Klonen sowie einer modifizierten *At4CL2* als Kontrolle, führt zu charakteristischer Färbung des Reaktionsansatzes. Dargestellt sind sechs von insgesamt 18 auf 4CL-Aktivität getesteten unterschiedlichen Klonen der pQE-70 Serie von *At4CL4*-Expressionskonstrukten mit je drei unabhängigen Ansätzen. Als Kontrolle (+, roter Kasten) wurde eine heterolog exprimierte mutierte *At4CL2*-Variante mit erhöhter Aktivität gegenüber Ferulasäure eingesetzt.

Die Konstrukte 1, 4 und 6 zeigten gegenüber der Kontrolle eine schwächere, aber messbare Aktivität, wohingegen die Klone 2, 3 und 5 keine Aktivität aufwiesen. Aufgrund der hohen Ausfallrate wurden alle 18 Klone vollständig sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen ergab für keinen der Klone eine fehlerfreie Basenabfolge, statistisch verteilt wurden Basenaustausche, Deletionen und Insertionen detektiert, die allerdings keinem regelmäßigen Muster folgten. Die Aktivität der in Abbildung 15 gezeigten Klone ist daher auf nicht-lethale Mutationen der Proteinsequenzen zurückzuführen, der His₆-tag wurde jedoch in keinem Fall erhalten, weitere Isolierung und Reinigung war somit nicht möglich.

Um Artefakte der Proteinexpression auszuschließen, wurden 11 der Extrakte mittels Westernanalyse und einem 4CL Antikörper auf detektierbare Induktion getestet.

Zur Kontrolle wurde ebenfalls rekombinant erzeugte *At4CL2* und die modifizierte Variante LP3, die auch im Multititerplatten-Test Verwendung fand, auf die Nylonmembranen aufgetragen. In beiden Kontrollspuren wurden die spezifischen Banden erwarteter Größe detektiert. Bei den *At4CL4* Proben ist in der uninduzierten Kontrolle z.T. eine schwache Bande zu erkennen. Nach Induktion zeigten die enzymatisch aktiven Proben im Durchschnitt

die schwächsten Signale, Degradation ist in allen Proben deutlich zu erkennen, ebenfalls schwach in der Probe *At4CL2*.

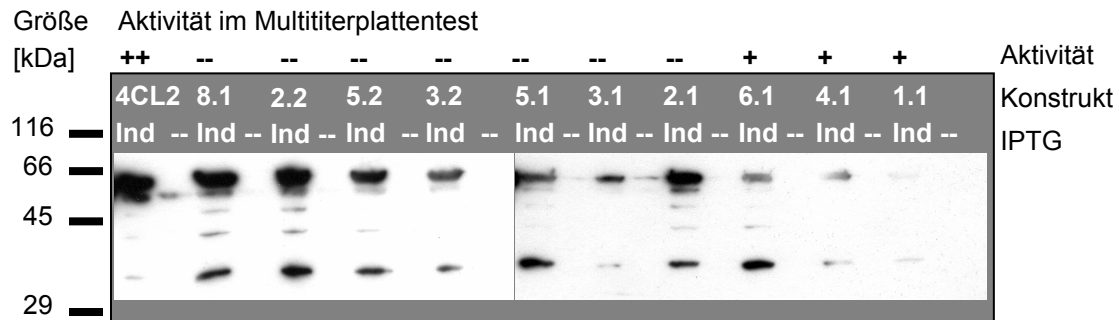


Abbildung 16: Westernblot von 10 Klonen der pQE-70 *At4CL4* Expressionsserie, *E. coli* Rohextrakt.

Zehn der insgesamt 18 bereits auf 4CL-Aktivität getesteten Klone der pQE-70 Serie von *At4CL4*-Expressionskonstrukten wurden in Flüssigkultur mit IPTG induziert. Aufgetragen wurden jeweils zwei Proben der Rohextrakte, die vor und zwei Stunden nach Induktion entnommen wurden. Als Kontrolle wurde ein parallel heterolog exprimiertes *At4CL2* eingesetzt. Der Protein-Blot wurde mit einem 4CL-spezifischen Antikörper hybridisiert, der ebenfalls aufgetragenes rekombinantes *At4CL2* auf dem Blot mit gleicher Größe detektierte.

Drei der Proben (6.1, 4.1, und 1.1) zeigten im Multititerplattentest 4CL-Aktivität.

3.2.3 Heterologe Expression von *At4CL4* mit dem pET-30 System

Nach Amplifikation und Subklonierung wurde das Fragment mit der vollständigen kodierenden Sequenz von *At4CL4* in den pET-30 Vektor ligiert. Mit Hilfe von PCR und Restriktionsendonuklease-Behandlungen konnten mutmaßlich positive Klone identifiziert werden. Nach Transformation und Induktion der heterologen *At4CL4*-Expression im Expressionsstamm wurden Proteine des Rohextraktes durch SDS-PAGE aufgetrennt und wie in in der folgenden Abbildung dargestellt durch Silberfärbung nachgewiesen.

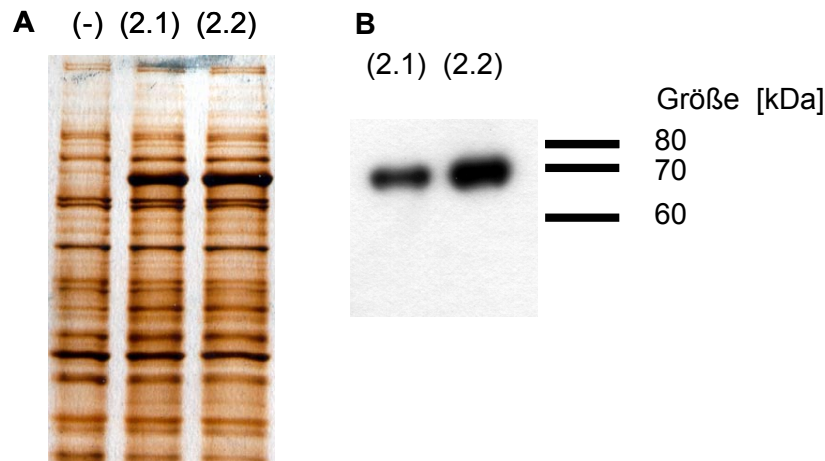


Abbildung 17: Heterologe Expression von At4CL4-His₆ in *E. coli* und Detektion des aufgereinigten rekombinanten Proteins.

A Silbergefärbtes SDS-PA Gel mit aufgetrennten *E. coli* Proteinrohextrakten. *E. coli* wurden transformiert mit leerem Expressionsvektor (-) sowie zwei unabhängigen pET-30 At4CL4-His₆ Expressionsproben (2.1) und (2.2) nach Induktion der Expression mit IPTG. **B** Das rekombinante C-terminale His₆-Fusionsprotein wurde über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt und mit einem 4CL-spezifischen Antikörper durch Western-Analyse detektiert. Die Größenmarker sind angegeben.

In zwei unabhängigen Proben konnte Akkumulation von Proteinen in den rekombinanten Klonen beobachtet werden. Nach der Aufreinigung wurden die heterolog exprimierte Proteine durch Western-Analyse mit einem 4CL-Antikörper detektiert. Die zuvor beobachtete Degradation der Proteine wurde nicht festgestellt, da durch den C-terminalen His₆-tag nur Proteine voller Länge aufgereinigt wurden, und Abbrüche nicht detektiert werden konnten. Somit wurde das At4CL4 Protein erfolgreich heterolog exprimiert und aufgereinigt. Den nächsten Schritt stellt die Untersuchung der Funktionalität des nativen Proteins dar.

3.2.4 Bestimmung der katalytischen Aktivität des rekombinanten At4CL4 Proteins

Die Stabilität der heterolog exprimierten At4CL4-Proteinfraktionen war gering. Lagerung bei -20°C führte zum Verlust der Aktivität. Daher wurden konzentrierte, aufgereinigte Fraktionen aliquotiert, mit β-Mercaptoethanol versetzt und bei -80°C gelagert. Da im Laufe einer Messreihe die Aktivität der Enzym-Fraktionen abnahm, wurden alle Messungen mit frisch verdünnten Lösungen durchgeführt. Die Untersuchung der Enzymaktivität erfolgte mittels eines spektrophotometrischen Testsystems, in dem die 4CL-katalysierte Bildung der CoA-Ester verschiedener Zimtsäure-Derivate bei den Absorptionsmaxima der Ester verfolgt wurde (Knobloch und Hahlbrock, 1975).

Beide unabhängig aufgereinigten Fraktionen des heterolog exprimierten At4CL4 setzten 4-Cumarsäure mit CoA zu dem entsprechenden aktivierten Ester um. Somit kodiert At4CL4 für eine weitere Isoform der Cumarat:CoA Ligasen in *A. thaliana*, wie es anhand der genomischen Sequenz-Analysen und der phylogenetischen Untersuchungen erwartet wurde.

Eine besondere Eigenschaft der 4CL-Isoformen in *A. thaliana* stellt ihre Substratspezifität dar. Alle bislang untersuchten rekombinanten Enzyme zeigten charakteristische Präferenzen

für einzelne Zimtsäure-Derivate (Ehltig et al., 1999). Um in diesem Kontext die *At4CL4* als eigenständige Isoform einzuordnen, sollten im Vergleich zu den bekannten 4CLs ebenso die Affinitäten und maximalen Umsatzraten gegenüber weiteren Hydroxylimtsäuren untersucht werden.

Substrate hierfür waren neben 4-Cumarsäure Kaffeesäure, Ferulasäure Sinapinsäure und die unsubstituierte Zimtsäure. Die Strukturformeln sind in Abbildung 18 wiedergegeben.

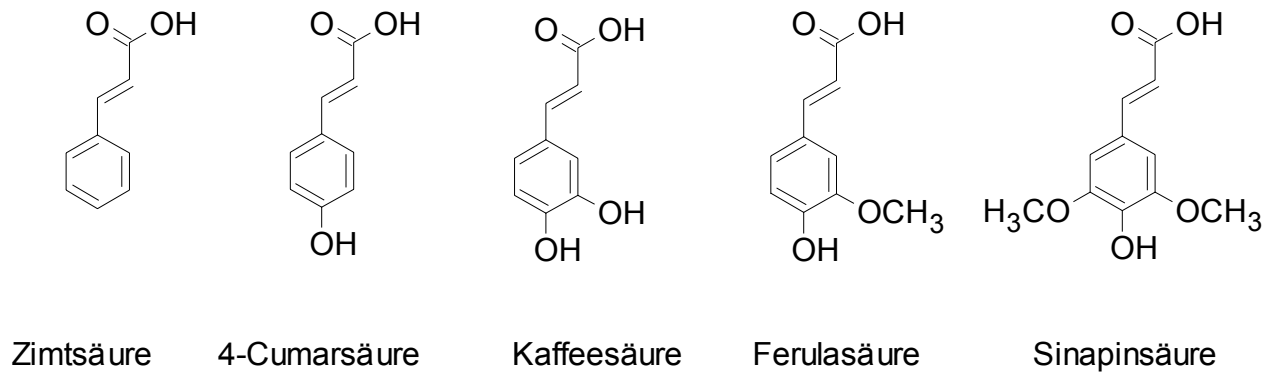


Abbildung 18: Zimtsäure und ihre Derivate, eingesetzt in der Analyse der *At4CL4*-Enzymeigenschaften.

Die Aktivitätsmessungen wurden mit Substratkonzentrationen von 5 bis 500 μM , bzw. 2,5 mM für Zimtsäure durchgeführt. Direkte Auftragung der Messergebnisse ergab hyperbole Kurven für die Bildung der CoA-Ester in Abhängigkeit der Substratkonzentrationen, die katalysierten Reaktionen folgten somit der Michaelis-Menten-Beziehung. Es traten wie bei den zuvor ermittelten Enzymeigenschaften der *At4CL1-3* deutliche Unterschiede in der Anfangssteigung, der Höhe des Plateaus und der erforderlichen Substratkonzentration auf. Die apparenten K_m - bzw. V_{max} -Werte wurden für die verschiedenen Substrate durch Transformation der Messergebnisse nach Hanes bestimmt (lineare Regression von v/s gegen s , dargestellt in Abbildung 19). Transformation nach Lineweaver-Burk, bzw. Eadie-Hofstee ergaben zumeist vergleichbare Werte für K_m und V_{max} , wurden jedoch nicht in die Kalkulation miteinbezogen.

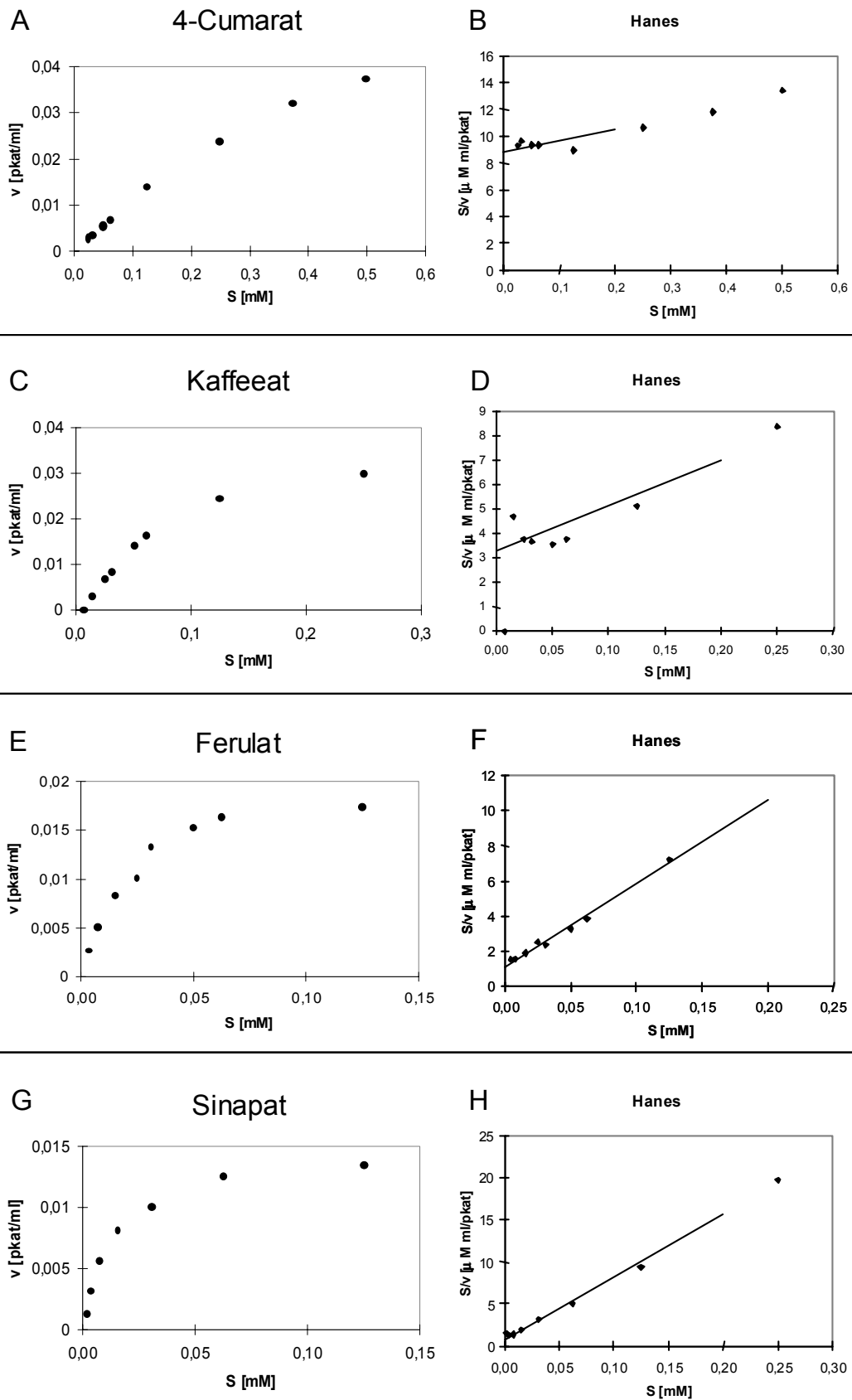


Abbildung 19: Aktivität der A14CL4 gegenüber 4-Cumarat, Kaffeeat, Ferulat und Sinapat. (Weitere Beschriftung befindet sich auf der nächsten Seite)

Abbildung der vorigen Seite: Aus induzierten Bakterienkulturen, die das *At4CL4*-pET-30 Konstrukt enthielten, wurden Proteinextrakte hergestellt. Die rekombinante *At4CL4* wurde mittels des C-terminal gekoppelten His₆-tags aufgereinigt und für die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeiten (v) bei Änderung der Substratkonzentration (S) eingesetzt. Man beachte, dass sich die Konzentrationsbereiche der Sinapinsäure (**G**) und der Ferulasäure (**E**) von den anderen Substraten (**A**, **C**) unterscheiden. Zur Ermittlung der apparenten K_m - und V_{max} -Werte für die Umsetzung der einzelnen Substrate wurden die Messergebnisse nach Hanes transformiert und jeweils S/v gegen S aufgetragen (**B**, **D**, **F** und **H**).

Eine Umsetzung von Zimtsäure ließ sich auch mit hohen Konzentrationen nicht messen.

4-Cumarat wurde im Vergleich zu den anderen Substraten am schwächsten umgesetzt, die Affinität war sehr niedrig, repräsentiert durch einen K_m -Wert von über 400 μM . *At4CL4* zeigte im weiteren Vergleich die höchste Affinität gegenüber den höher substituierten Zimtsäure-Derivaten Sinapinsäure und Ferulasäure (im Bereich von 20 μM , bzw. 30 μM). Der K_m -Wert für Kaffeesäure dagegen wurde etwa fünf- bis zehnfach höher bestimmt.

Mit dieser Substratspezifität nahm die *At4CL4* innerhalb der Familie eine absolute Sonderstellung ein, denn für keine der anderen 4CLs konnte eine Sinapat-Aktivierung nachgewiesen werden.

Über die Bestimmung der Proteinkonzentration war die spezifische Aktivität zugänglich. Hier bestätigten sich die zuvor gewonnenen Informationen. *At4CL4* zeigte hohe spezifische Aktivität gegenüber Sinapat, während Kaffeeat am schlechtesten umgesetzt wurde. Es ergibt sich aber ebenfalls eine signifikante Aktivität gegenüber 4-Cumarat.

Der Quotient aus K_m und V_{max} stellt ein Maß dar, mit welcher Häufigkeit ein gegebenes Substrat im Vergleich zu den anderen Substraten umgesetzt wird. Auf den in diesem Zusammenhang verwendeten Begriff der Präferenz innerhalb eines Gemischs wird hier verzichtet, da allosterische Effekte wie Substratinhibition bereits beschrieben wurden (Harding et al., 2002). Die aus V_{max}/K_m abgeschätzte Spezifität für *At4CL4* zeigte erneut Bevorzugung von Sinapat, gefolgt von Ferulat. Die Werte für Kaffeeat und schließlich 4-Cumarat zeigten eine Tendenz von *At4CL4* höher substituierte Substrate zu bevorzugen.

In Tabelle 2 sind die kinetischen Daten der *At4CL4* zusammengefasst. Kontrollexperimente wurden mit Ansätzen durchgeführt, in denen einer der Co-Faktoren ATP, Coenzym A oder Substrat fehlte. In diesen Fällen konnte keine Umsetzung beobachtet werden.

At4CL4	Substrat	Km [μM]	Spezifische [Vmax/mg]	Aktivität Vmax/Km [1/ μM]
2.1	Zimtsäure	keine messbare Umsetzung		
	4-Cumarat	436	124	0,3
	Kaffeeat	271	266	1,0
	Ferulat	23	200	9,5
	Sinapat	17	123	9,2
2.2	Zimtsäure	keine messbare Umsetzung		
	4-Cumarat	427	75	0,2
	Kaffeeat	102	108	1,1
	Ferulat	29	106	3,7
	Sinapat	23	87	4,2

Tabelle 2: Michaelis-Menten-Konstanten (Km), spezifische Aktivitäten und relative Spezifitäten von At4CL4.

Zwei unabhängig heterolog exprimierte und aufgereinigte At4CL4-Präparationen wurden eingesetzt, um die kinetischen Enzymeigenschaften zu ermitteln. Die Km- und Vmax-Werte wurden nach Hanes bestimmt. Für die spezifische Aktivität wurden die Proteinkonzentrationen der Präparationen gemessen und in Relation zu den absoluten Vmax-Werten ([$\mu\text{kat}/\text{mg}$]) gesetzt. Die Werte entsprechen Mittelwerten aus mindestens drei unabhängigen Messreihen. Die Daten der Sinapat-Aktivität beruhen auf den Mittelwerten von zehn (2.1), bzw. sechs (2.2) Messungen.

Da At4CL4 mit der Sinapinsäure-Aktivierung eine Affinität zu hoch substituierten Zimtsäure-Derivaten zeigte, stellte sich die Frage, ob möglicherweise weitere, hoch substituierte unpolare Derivate ebenfalls aktiviert werden können. Die folgende Grafik gibt die kinetischen Eigenschaften der At4CL4 bei Umsetzungen verschiedener nicht-4-hydroxylierter di- und tri-Methoxyzimtsäuren wieder. Eine zusammenfassende Darstellung der Substratspezifität der At4CL4 ist in der darauffolgenden wiedergegeben.

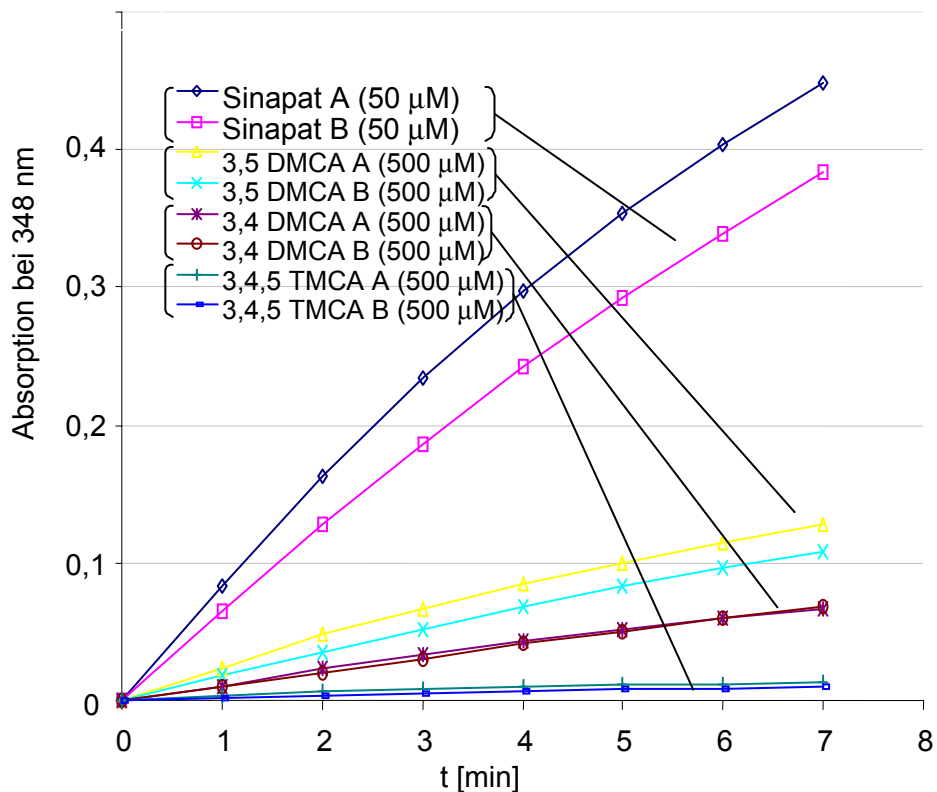


Abbildung 20: Kinetische Eigenschaften der heterolog exprimierten At4CL4 gegenüber nicht-4-hydroxylierten Substraten.

Die Umsetzung eines 4-Cumarat-Derivats (Sinapinsäure) wurde verglichen mit der Aktivierung nicht-hydroxylierter Zimtsäure-Derivate. Die Reaktion wurde photometrisch über die Absorptionzunahme ($A_{348\text{nm}}$) verfolgt. Alle Messungen wurden in unabhängigen Duplikaten durchgeführt (A) und (B). Es war erforderlich, mit einer zehnfach höheren Konzentration der Di- und Tri-Methoxyzimtsäuren (DMCA und TMCA, 500 μM) im Vergleich zu der Sinapinsäure (50 μM) zu arbeiten, um in Bereiche reproduzierbarer Absorption zu gelangen. (DMCA, 3,4/3,5-Dimethoxyzimtsäure, TMCA, 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure)

At4CL4 setzte die Di- und Tri-Methoxyzimtsäuren deutlich schlechter um, als das natürlich vorkommende Sinapat. Die Hydroxylierung der Zimtsäure zur 4-Cumarsäure ist offenbar erforderlich, um das Grundgerüst eines Substrates zu erzeugen. Damit erschien die Möglichkeit, dass At4CL4 durch die erhöhte Affinität zu unpolaren Substraten *in vivo* Fettsäuren umsetzen könnte, äußerst unwahrscheinlich, weitere Substrate wurden daher nicht getestet.

In der folgenden Abbildung 21 sind die Daten der At4CL4-Substratspezifität zusammengefasst.

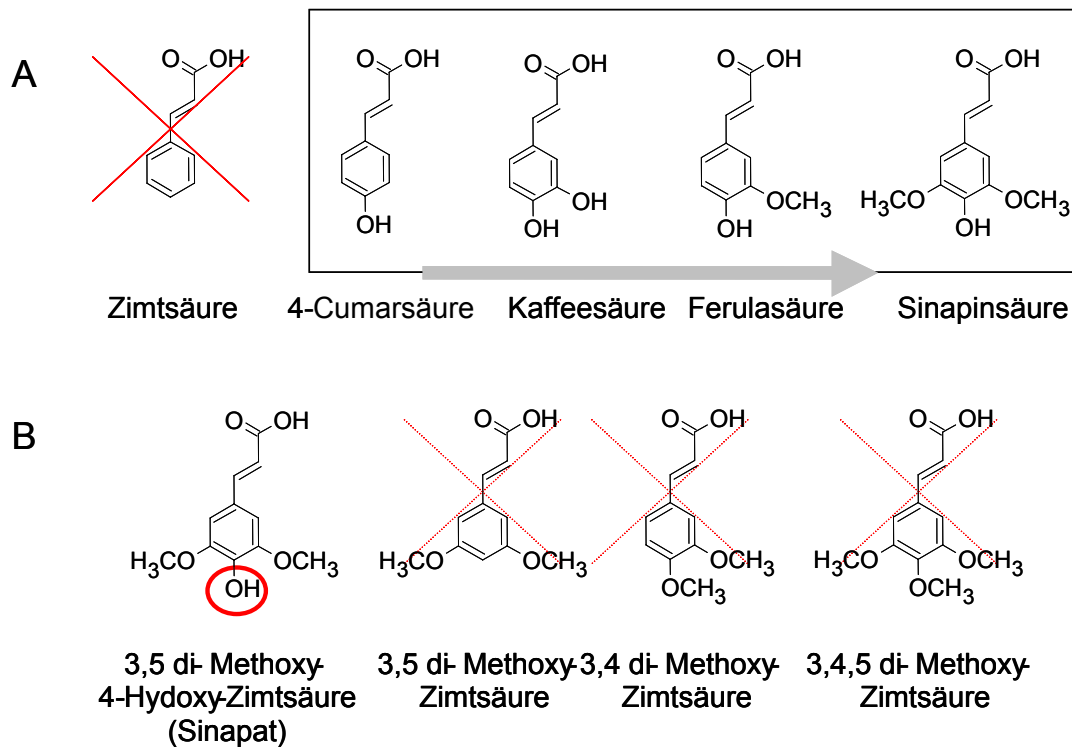


Abbildung 21: Übersicht der Substratspezifität der heterolog exprimierten und gereinigten At4CL4.

A 4-Hydroxy-Zimtsäure-Derivate des Phenylpropanstoffwechsels wurden in *in-vitro* Enzym-Assays mit zunehmenden Substitutionen besser umgesetzt. **B** Die Aktivierung nicht-in 4-Position hydroxylierter Substrate zu den CoA-Thioestern wurde nur sehr schwach katalysiert.

Nachdem durch die Enzymkinetiken erste Informationen der *in-vitro* Funktion dieser sehr speziellen At4CL gewonnen wurden, ist die Untersuchung der transkriptionellen Regulation in der Pflanze ein Schritt in die Analyse der Aufgabe von At4CL4 *in vivo*.

3.2.5 Expressionsstudien

Für die übrigen Mitglieder der At4CL-Genfamilie sind umfangreiche Informationen über differenzielle Transkription bekannt, die zusammen mit den *in-vitro* Daten Grundlage des Modells des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels in *A. thaliana* bilden. Untersuchung gewebespezifischer und stimulusabhängiger Expression soll bei der Einordnung von At4CL4 in dieses Modell helfen.

Nach der Analyse der Substratspezifität nimmt At4CL4 eine deutliche Sonderstellung innerhalb der At4CLs ein. Daher war die gewebespezifische Regulation der Expression von At4CL4 im Vergleich zu allen anderen At4CLs von großem Interesse. Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung der At4CL4 mRNA Akkumulation in verschiedenen Organen 4 Wochen alter Pflanzen, die unter Standardbedingungen angezogen wurden, sowie in steril in Flüssigkultur angezogenen Wurzeln des gleichen Alters. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus ausgewachsener Wurzelkultur, vollentwickelten Rosettenblättern, Sprossachsen, Sprossblättern, Blüten und Schoten isoliert.

Northern-Untersuchung zur Analyse gewebespezifischer Expression der At4CL4

Es wurden in zwei unabhängigen Experimenten 20 µg gesamt-RNA jedes Gewebes gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen übertragen und mit radioaktiv markierter Vollängen- At4CL4 Sonde hybridisiert. Selbst nach zweiwöchiger Exposition konnten keine At4CL4 spezifischen Hybridisierungssignale auf den RNA-Blot Membranen beobachtet werden. Parallel wurde eine Membran eingesetzt die 0,5, 1 und 5 ng aufgereinigter At4CL4 sowie At4CL1, At4CL2 und At4CL3 cDNA trug. Die At4CL4 Sonde zeigte unter den verwendeten stringenten Bedingungen keine Kreuzhybridisierung mit den anderen At4CLs, das At4CL4 Signal jedoch konnte reproduzierbar nachgewiesen werden. Da das Ausbleiben von Signalen auf ein niedriges Expressionsniveau zurückgeführt wurde, verstärkt durch das Fehlen von EST-Klonen in den *A. thaliana*-Datenbanken, erforderte die weitere Untersuchung der Expression von At4CL4 die wesentlich empfindlichere RT-PCR Methode.

RT-PCR zur Expressionsanalyse von At4CL4 in verschiedenen *A. thaliana* Organen

Der Vorteil der RT-PCR-Methodik ist ihre hohe Empfindlichkeit. Dies macht sie im Gegenzug anfällig für Kontaminationen. Speziell bei Untersuchungen zu einzelnen Mitgliedern hoch homologer Familien ist die Spezifität der Reaktion entscheidend für ihre Aussagekraft. In diesem Experiment sollte mit Hilfe der RT-PCR das Expressionsniveau von At4CL4 in verschiedenen Geweben neben allen weiteren At4CLs untersucht werden. Hierfür war die Wahl geeigneter Oligonukleotide essentiell.

Es konnten in umfangreichen Vortests zu allen At4CL Genen für die Analyse der Expressionsniveaus hinreichend spezifische Oligonukleotidpaare entwickelt werden. Die Bedingungen für die spätere Untersuchung wurden durch Reaktionen aller Oligonukleotidpaare auf cDNAs aller entsprechenden Gene ermittelt. Ebenso wurde sichergestellt, dass genomische DNA Kontamination keine Matrize für mögliche Nebenreaktionen darstellt, es konnten selbst mit einhundertfach höherer Konzentration genomischen Templates keine Signale detektiert werden.

PCR auf cDNA

Es stellte sich heraus, dass reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse nur erhalten werden konnten, wenn alle Reaktionen mit gleicher Menge an Matrize in einem Block des PCR-Cyclers mit identischem Programm abliefen. Die Optimierung der Bedingungen umfasste ebenfalls die Beschränkung auf einen Typ an Reaktionsgefäßen und eine Maschine.

Alle im Folgenden durchgeführten RT-PCRs wurden mit diesen Parametern durchgeführt, unter der Annahme, dass der negative Einfluss an homologen, ähnlichen Zielmolekülen in einer Verteilung an cDNAs niedriger ist, als bei der in Abbildung 22 dargestellten Kontrolle mit klonierter cDNA jeden Gens.

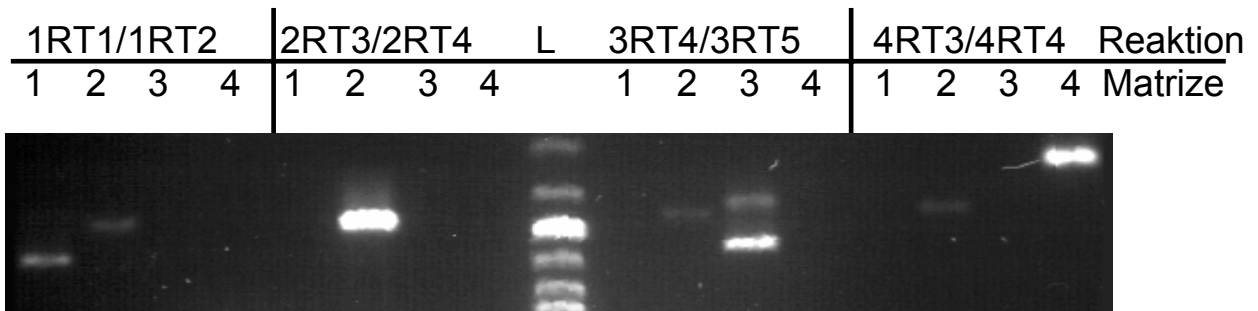


Abbildung 22: Kontrolle der RT-PCR Oligonukleotide auf klonierter cDNA.

Jedes Paar Oligonukleotide, spezifisch jeweils für eine der vier *At4CLs* wurde in einer PCR unter den Bedingungen getestet, die später für die RT-PCR vorgesehen waren. Als Template dienten jeweils alle vier cDNAs. Dargestellt sind die Reaktionen nach Kombination der RT-Oligonukleotide (Genname, RT, Oligonukleotid1 und 2) und Matrize (1 bis 4 für *At4CL1-4* cDNA). (L, 100 bp Leiter)

Es traten zwar z.T. schwache Nebenbanden in den Reaktionen auf, diese ließen sich aber problemlos durch die Größe von der Produktbande unterscheiden und sind darauf zurückzuführen, dass mit 10 ng klonierter cDNA ein milliardenfacher Überschuss an "falschem" Template im Vergleich zu der Verteilung in einem cDNA-Pool einer RT-PCR vorlag. Banden der hier detektierten Größe wurden in den analytischen RT-PCRs in keinem Fall detektiert. Somit waren die Bedingungen optimiert, um mit der RT-PCR qualitativ die Expressionsniveaus der *A. thaliana* 4CLs zu untersuchen.

Alle Zielbereiche der Reaktionen auf den *At4CL* cDNAs waren zunächst zur Differenzierung der Produkte von unterschiedlicher Größe. Für *At4CL3* wurde nach Überprüfung der Spezifität eine Oligonukleotidpaarung zur Erzeugung eines Fragments vergleichbarer Größe wie *At4CL1* eingesetzt. Zur positiven Kontrolle der Reaktion und der Überprüfung der Bandengröße wurde die spezifische cDNA parallel eingesetzt.

RT-PCRs

At4CL1 mRNA Akkumulation konnte am stärksten im Spross nachgewiesen werden, schwache Signale waren in der Blüte und in Sprossblättern zu erkennen, in Rosettenblättern trat ein Signal nach Erhöhung der Zyklenzahl ebenfalls auf. In der Wurzelprobe war *At4CL1* cDNA nicht nachweisbar.

At4CL2 cDNA war im Wurzelgewebe, im Spross sowie im Blütengewebe detektierbar, bei Erhöhung der Zyklenzahl war die cDNA in allen Geweben nachweisbar.

At4CL3 cDNA akkumulierte stark im Blütengewebe, war schwach auch in Sprossblättern und im Spross sowie bei erhöhter Zyklenzahl in Rosettenblättern nachweisbar.

Das Gleichbleiben der Intensität der jeweils stärksten Signale bei Erhöhung der Zyklenzahl war ein Hinweis auf Erreichen des Reaktionsplateaus. Vergleiche innerhalb einer Reaktion mit Verlassen der exponentiellen Phase nicht mehr zulässig, geringste Mengen an cDNA konnten jedoch so detektiert werden.

Das als Kontrolle gewählte konstitutiv exprimierte *AtActin1* (*Ac1*) zeigte nach der PCR wie erwartet annähernde Gleichverteilung in den unterschiedlichen Organen, dargestellt sind zwei unabhängige Reaktionen mit 25 und 35 Zyklen, die unter *AtActin1*-spezifischen PCR Bedingungen durchgeführt wurden. Genomische Kontamination der cDNA, die an einer Bande mit 733 bp zu erkennen gewesen wäre, konnte nicht detektiert werden.

Die Expression der *At4CL1*, *At4CL2* und *At4CL3* entspricht der beschriebenen differentiellen organspezifischen Regulation (Ehlting et al., 1999). Die Methode ist somit geeignet die Expression von *At4CL4* auf diesem Niveau zu untersuchen.

Im Gegensatz zu *At4CL2* ist das homologe *At4CL4* nicht in Wurzeln detektierbar, Expression ist jedoch in allen anderen oberirdischen Organen, mit einer verstärkten Detektion im Spross nachzuweisen.

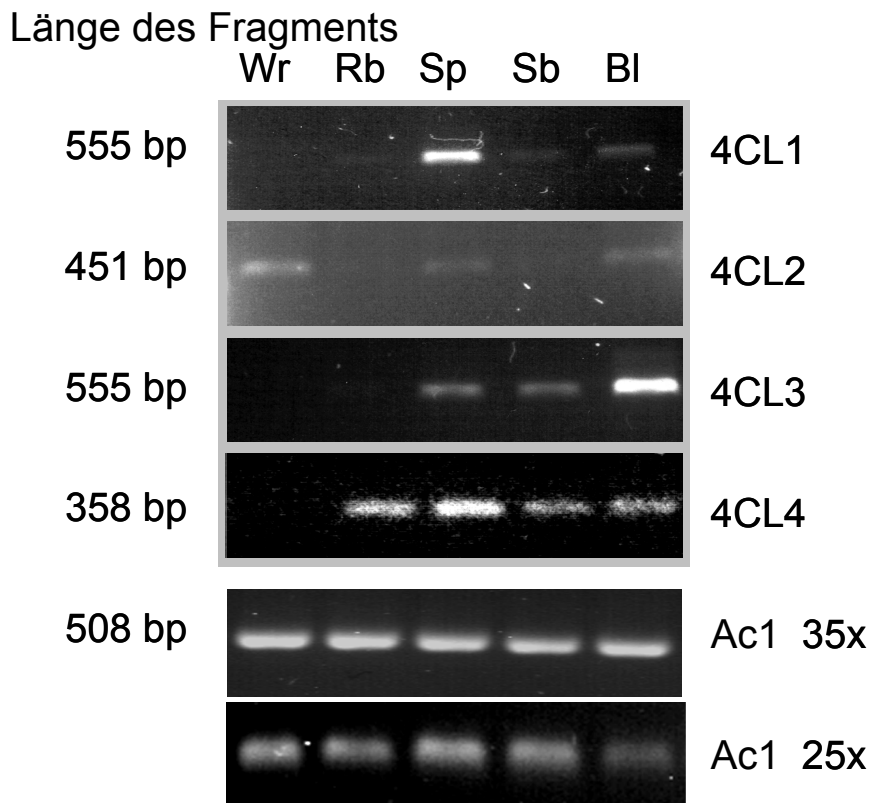


Abbildung 23: Expressionsanalyse der *At4CL*-Familie durch RT-PCR.

Mit genspezifischen Oligonukleotiden wurden parallel PCRs zu jeder *At4CL* auf revers transkribierter RNA verschiedener Gewebe durchgeführt (Wr Wurzelgewebe aus steril angezogener Flüssigkultur, Rb Rosettenblätter, Sp Spross, Sb Sprossblätter, Bl Blüte). Zur Kontrolle der cDNAs wurde eine PCR mit Actin1-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt.

Zur positiven Kontrolle der Reaktion und der Überprüfung der Bandengröße wurde die spezifische cDNA parallel eingesetzt. Durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen konnten *At4CL1*-, *At4CL2*- und *At4CL3*-Produkte unterschieden werden, das Produkt der *At4CL4*-RT-PCR wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die jeweiligen Unterschiede der absoluten Signalstärken sind auf geringfügige Unterschiede der Oligonukleotidpaare zurückzuführen, es ist keine vergleichende Aussage zu absoluten Expressionsmustern zwischen den einzelnen Genen möglich.

At4CL4 zeigte somit in diesem Experiment eine zu *At4CL2* komplementäre Expression in den untersuchten Organen. Daher war es von besonderem Interesse, die stimulusabhängige Änderung der Transkript-Akkumulation von *At4CL2* und *At4CL4* im Kontext der beiden anderen Familienmitglieder zu vergleichen.

RT-PCR zur Expressionsanalyse von At4CL4 nach Licht- und Elicitorbehandlung

Aufgrund der im *At4CL4*-Promotor entdeckten mutmaßlich *cis*-aktiven Elemente (Regionen, die an der Lichtregulation beteiligt sein können sowie W-Box Motive) und den umfangreichen Kenntnissen über die Transkript-Akkumulation in Antwort auf Lichtstress, bzw. Pathogenbefall in der *At4CL*-Familie wurde die Expression von *At4CL4* in Zellkultur untersucht, die sowohl UV-, als auch Elicitor-behandelt wurde. Die RNA, die für diese Untersuchungen zum Einsatz kam, wurde freundlicherweise von E. Logemann zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden isoliert aus dunkeladaptierter *A. thaliana*-Zellkultur, die mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlt wurde. Parallele Proben wurden mit Pmg-Rohelicitor behandelt. In einer weiteren Serie wurde zur lichtbehandelten Zellkultur ebenfalls Pmg-Rohelicitor zugegeben.

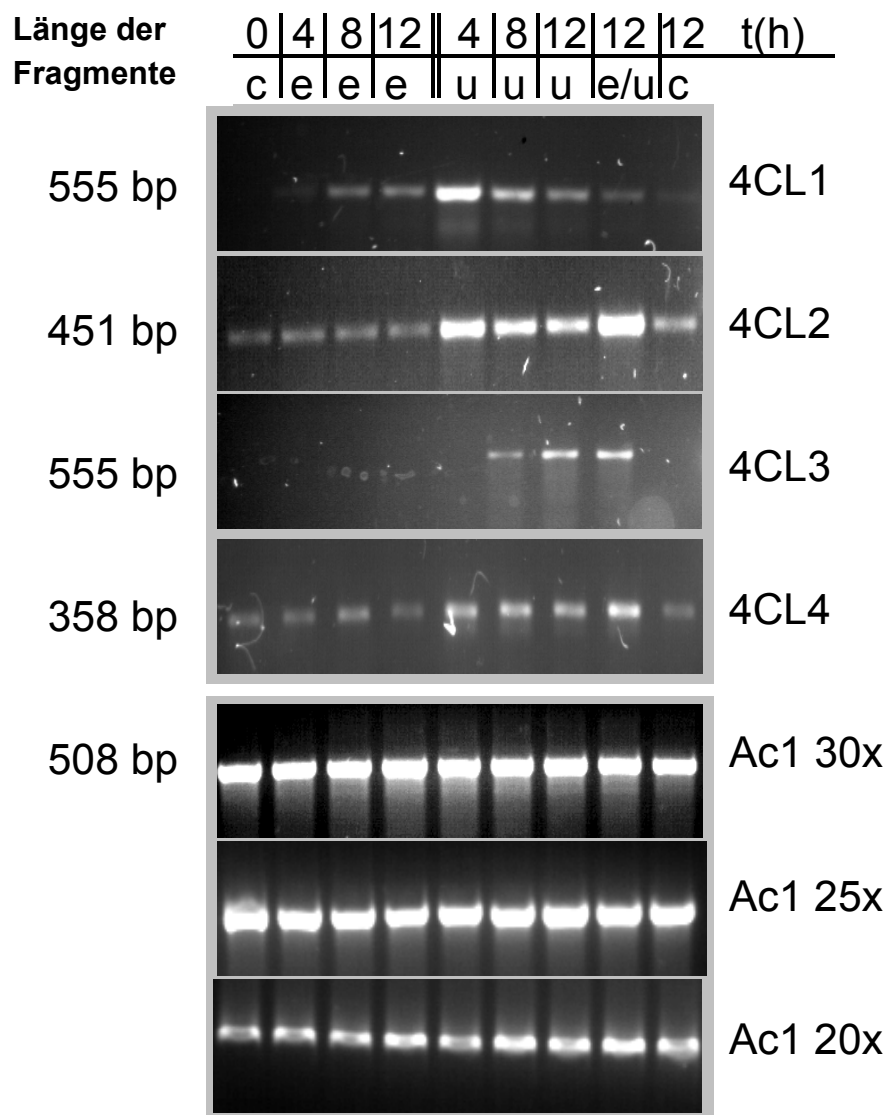


Abbildung 24: Expressionsanalyse der *At4CL*-Familie in Licht- und Elicitor-behandelter Zellkultur.

Mit genspezifischen Oligonukleotiden wurden parallel PCRs zu jeder *At4CL* auf revers transkribierter RNA durchgeführt. Aus UV- (u) und Pmg-Rohelicitor (e) behandelter *A. thaliana* Zellkultur wurde RNA isoliert und revers transkribiert. Eine PCR wurde zur

qualitativen Analyse der Transkript-Akkumulation der *At4CL*-Familie eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNAs wurde parallel eine PCR mit Actin1-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt.

At4CL4 und *At4CL2* sind in Zellkultur schwach exprimiert. Dagegen konnten in der Kontrolle keine Signale für *At4CL1* und *At4CL3* nachgewiesen werden. Wie bereits zuvor beschrieben (Ehltling et al., 1999), konnte für *At4CL1* Induktion durch Elicitor nachgewiesen werden. *At4CL2* reagierte nur sehr schwach, kaum messbar auf den Stimulus. Die Expression von *At4CL3* ist wie bereits beschrieben unabhängig von der Zugabe von Elicitor, die Mengen von Transkript stiegen jedoch deutlich nach Bestrahlung mit UV-Licht an. *At4CL1* und *At4CL2* Transkripte akkumulierten ebenfalls deutlich und schneller als *At4CL3* in den lichtbehandelten Proben, die Niveaus nahmen aber bis zu 12 Stunden nach Behandlung langsam ab. Dieser transiente Verlauf wurde ebenfalls bereits früher auf Pflanzebene beschrieben (Ehltling et al., 1999). Zugabe von Pmg-Rohelicitor zu bereits bestrahlten Zellen ergab für *At4CL1* zum Zeitpunkt 12 Stunden nach der Behandlung kaum Änderung der Expression, allenfalls eine schwache Repression könnte erkennbar sein. Ein hierzu gegensätzliches Bild zeigte die Akkumulation von *At4CL2*-Transkript, dessen Niveau deutlich durch die Elicitor-Behandlung anstieg. Die Expression von *At4CL3* blieb unbeeinflusst nach der Zugabe des Elicitors. Die Kontrollwerte zum Zeitpunkt 12 Stunden zeigen ausser einem schwachen Signal von *At4CL1* keine Änderung zu dem Anfangswert. Diese Daten untermauern bereits bekannte Expressions-Analysen auf Northern-Ebene und zeigen, dass das Experiment geeignet ist, die Expression des letzten *At4CL*-Familienmitglieds im Kontext der anderen Isoformen zu untersuchen.

At4CL4 ist schwach konstitutiv exprimiert. Durch Elicitor wurde die Transkription von *At4CL4* sehr schwach, mit einem Maximum bei 8 Stunden induziert. Im Vergleich zu *At4CL1* und *At4CL2* reagierte *At4CL4* ebenfalls mit schneller, transients Akkumulation von Transkript auf UV-Bestrahlung, das Niveau scheint aber unter dem der *At4CL1* und *At4CL2* zu liegen. Wie bei *At4CL2* wurde durch gleichzeitige Bestrahlung und Behandlung mit Elicitor die Transkriptmenge erhöht.

3.3 Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung von *A. thaliana* Nullmutanten im Phenylpropanstoffwechsel

Eine elegante Methode der funktionellen Charakterisierung von Proteinen *in vivo* stellt ein reverser Ansatz dar. Die Isolierung von Nullmutanten der zu untersuchenden Gene und die Untersuchung des Phänotyps erlaubt Rückschlüsse auf die Rolle des vom Gen kodierten Proteins. Spezifische Funktionen individueller Mitglieder von Multigen-Familien können entschlüsselt werden, und biochemische Analysen decken mögliche Ausweich-Stoffwechselwege auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mutanten-Populationen durchsichtet und Mutanten für Gene des Phenylpropanstoffwechsels, mit Schwerpunkt auf der Familie der *At4CLs*, identifiziert. Wo es möglich war, wurden die individuellen Pflanzen isoliert und die Mutationen genetisch analysiert. Nach der Bestätigung des jeweiligen Genotyps wurden ausgewählte Linien molekularbiologisch untersucht, mit dem Ziel nachzuweisen, dass es sich um echte Nullmutanten handelt, dass Transkript des Gens also nicht nachweisbar oder

nachweisbar defekt war. Im Anschluss an die molekularbiologische Charakterisierung begann die phänotypische Beschreibung der positiven Linien. Auf morphologische Untersuchungen folgten biochemische Analysen.

Zu Überwindung der partiell funktionellen Redundanz der isolierten *At4CL* Nullmutanten und zur Verknüpfung mit weiteren Mutantenlinien des Phenylpropanstoffwechsels war es erforderlich, Einzelmutanten in geeigneten Kombinationen miteinander zu kreuzen.

3.3.1 Die *At4CL1*-Nullmutante *ZI4cl1*

Die Mutante des Gens *At4CL1* (*At4CL1.2-19.23.10*, im weiteren Kontext als *ZI4cl1* bezeichnet) wurde von J. Hageneier in der ZIGIA-Population (einzelne Linie 5J6636) identifiziert. Die Excision des mobilen *En-1* Transposons hatte in der isolierten Linie einen *footprint* in der kodierenden Region von *At4CL1* hinterlassen, der durch eine Leserasterverschiebung zu frühzeitigem Abbruch der *At4CL1*-Proteinsequenz führt. Weiterhin konnte von J. Hagemeier durch eine Northern-Analyse gezeigt werden, dass *At4CL1*-Transkript in unveränderter Menge in der Mutanten-Linie akkumuliert, dennoch aber die 4CL-Enzymaktivität in Enzymtests mit Rohextrakten in *ZI4cl1*-Stängeln durch die Mutation auf 10 % reduziert wurde.

Eine Southern-Analyse zeigte, dass der genomische Hintergrund der *ZI4cl1*-Linie mindestens weitere 12-13 Transposons enthielt. Vor Beginn weiterer Analyse war es wichtig den durch die Transposon-Aktivität mutagenisierten Hintergrund zu reduzieren, weitere unerwünschte *footprints* zu entfernen und letztlich die Menge an Transposons zu minimieren. Es ist für Kreuzungen mit Linien, die stabilisierte, nicht-autonome Transposon-Insertionen (wie die der SLAT-Population) tragen essentiell, dass jede Transposase-Aktivität des Kreuzungspartners *ZI4cl1* eliminiert wurde, somit alle Transposons durch Rückkreuzungen gegen Columbia-Wildtyp entfernt wurden, da die von *En-1* kodierte Transposase die stabilisierten Transposons re-mobilisieren würde.

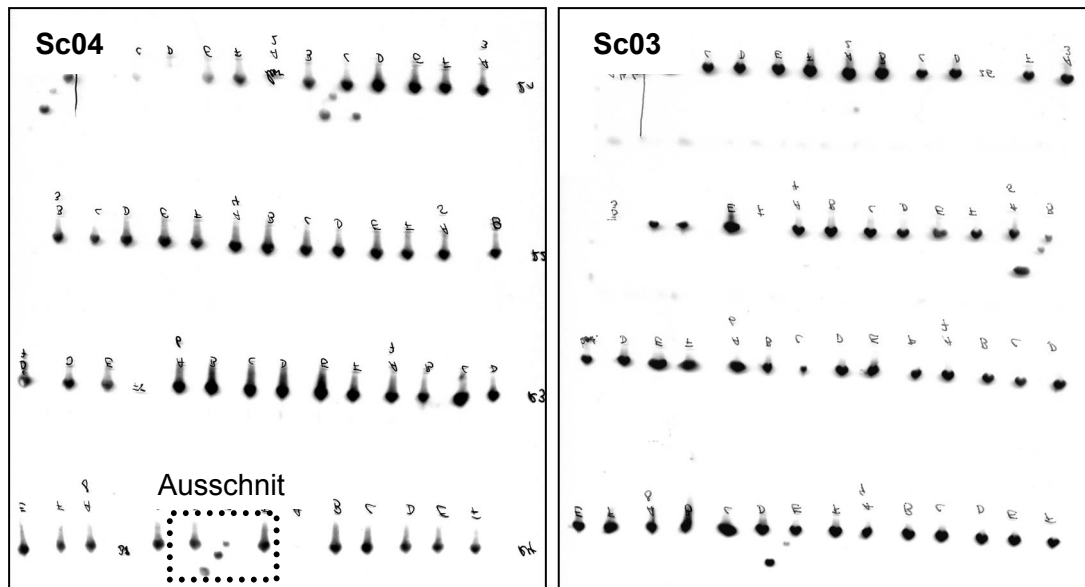
Nach 9 Runden von Rückkreuzungen konnte durch PCR bestätigt werden, dass die Linie *ZI4cl1* keine Transposons mehr enthielt.

3.3.2 Identifizierung und Isolierung einer weiteren *At4CL1*-Nullmutante

Anhand der Informationen der von Syngenta (TMRI) zur Verfügung gestellten Datenbanken konnte eine *At4CL1*-Mutantenlinie in der GARLIC-Population identifiziert werden. Die molekularbiologische Charakterisierung der isolierten Linie *GA4cl1* (350_H10 gi5702183) bestätigte eine einzelne Insertion von T-DNA im ersten Intron der genomischen *At4CL1*-Sequenz an Position 2492. Durch die Größe der T-DNA Insertion mit 5,5 kb war eine Nullmutation sehr wahrscheinlich.

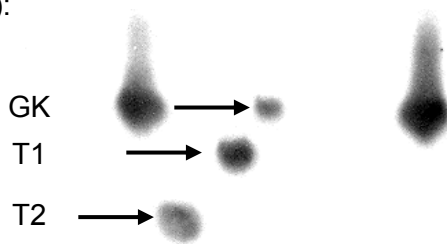
3.3.3 Identifizierung und Isolierung von *At4CL2*-Nullmutanten

Zur Identifizierung einer *At4CL2*-Nullmutante wurden sowohl die ZIGIA-Population, als auch die SLAT-Linien durchsichtet. Repräsentativ für die Durchsichtung der SLAT-Population und die Strategie zum Nachweis der Integration von Transposon- oder T-DNA der anderen Populationen ist das Schema in Abbildung 25.



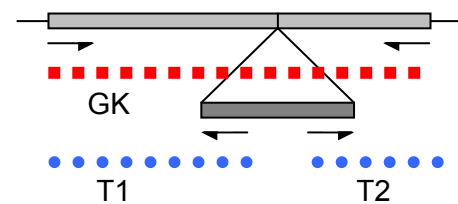
Ausschnitt

Größe (bp):



Position:	D8	E8	F8
Reaktion:	T1	T2	GK
Ergebnis:	-	-	+

Schema Transposonintegration



	spezifische Oligonukleotide
GK:	Gen 1 – Gen 2
T1:	Transposon 1, 2 -- Gen 1
T2:	Transposon 1, 2 – Gen 2

Abbildung 25: PCR-Southern zur Suche nach *A14CL2*-Integrationslinien in der SLAT-Population.

Es wurden jeweils 3 PCR's auf Einzelpflanzen-DNA durchgeführt. Die genomische Kontrollreaktion erzeugte Signale mit zwei genspezifischen Oligonukleotiden, die das Gen abdeckten. In den Testreaktionen wurde eine Kombination beider transposonspezifischer Oligonukleotide mit jeweils einem genspezifischen Oligonukleotid eingesetzt. Anschließend wurden die auf Nylonmembranen übertragenen PCR-Produkte mit einer genspezifischen DIG-Sonde hybridisiert. Dargestellt sind die Signale zweier Subpools (**Sc03** und **Sc04**), die je 56 Linien repräsentieren. Signale in den Testreaktionen wurden erhalten, wenn die genspezifischen Oligonukleotide die Integrationsstelle flankierten. Der Ausschnitt zeigt die Vergrößerung der Reaktionen einer mutmaßlichen *SL4cl2*-Integrationslinie mit den Koordinaten Sc04, E8. Rechts davon dargestellt ist das Schema, nach dem die Produkte erzeugt wurden. Pfeile markieren Signale der T1- und T2-Reaktionen.

Abbildung 25 zeigt die Identifizierung einer putativen Insertionslinie in einem aus 50 individuellen Linien bestehenden Subpool der SLAT-Population. Die untersuchten Subpools wurden zuvor über Hybridisierung eines Filters identifiziert, der flankierende Regionen der Transposon-Linien trug (nicht gezeigt).

Anhand des Schemas konnte eine putative *At4CL2*-Mutante, SL4cl2, isoliert werden (Pool 04.20). Molekularbiologische Untersuchung zeigte, dass die *At4CL2*-Mutantenlinie eine einzelne Integration des stabilisierten Transposons dSpm am Ende des ersten Exons in *At4CL2* (Position 2488 der genomischen Sequenz) trug. Sequenzierung des klonierten Bereichs ergab, dass hierdurch ein artifizielles Stopkodon in der Proteinsequenz an Position 323 erzeugt wurde. Auf RT-PCR-Ebene mit RNA von steril in Flüssig-Kultur angezogenen SL4cl2 und Col-0 konnte in der *At4CL2*-Nullmutante bei 25 Zyklen im Vergleich zu dem Wildtyp kein Transkript nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Segregationsanalyse zeigte Kosegregation der Insertion mit der vermittelten BASTA-Resistenz (siehe Kapitel 3.3.9), bestätigte eine einzelne Integration und führte in der F2-Generation zu der homozygoten Linie, die Ausgangspunkt für die weiteren Analysen war.

Über einen PCR-basierten Ansatz wurde ein Subpool (5AKB2) mit Pflanzen, die eine mutmaßliche Mutation für das Gen *At4CL2* trugen, in der ZIGIA-Population identifiziert. Molekularbiologische Analyse identifizierten eine Linie mit einer En-1 Insertion im erstem Exon von *At4CL2* an Position 2183 der genomischen Sequenz. Weitere Transposons im Hintergrund dieser Linie wurden detektiert. Der Ansatz zur Erzeugung einer stabilen *footprint*-Linie wurde nicht gestartet.

Weitere Populationen wurden für *At4CL2* nicht durchsichtet.

3.3.4 Identifizierung und Isolierung von *At4CL3*-Nullmutanten

Durchsichtung der ZIGIA-Population mit der *At4CL3*-Sequenz in voller Länge identifizierte mehrere putative Subpools mit Mutanten-Linien (5APB15, 6M29 und 6M31). Aus dem Subpool 5APB15 konnte eine Linie isoliert werden, deren molekularbiologische Charakterisierung eine En-1-Insertion im ersten Exon an der Position 995 der genomischen *At4CL3* Sequenz zeigte. Die anderen Pools erwiesen sich als falsch-positiv, es konnten keine weiteren Mutanten-Allele identifiziert werden. Der Hintergrund der isolierten Linie ZI4cl3 zeigte Anwesenheit von mehr als 8 Transposons. Analog zu der bereits oben beschriebenen Linie ZI4cl1 wurde eine Analyse gestartet mit dem Ziel der Identifikation einer stabilen, Transposon-freien *footprint*-Linie.

Basierend auf einer homozygoten Linie wurden die Nachkommen mittels PCR und Southern-Analyse auf Verlust der autonomen Transposon-Insertion im Gen *At4CL3* untersucht. Sektorbildung mit zahlreichen somatischen Excisions-Ereignissen machte diesen Ansatz nutzlos für die angestrebte Identifizierung, da die detektierten Änderungen nicht an die Nachkommenschaft weitergegeben wurden. Ein weiterer Ansatz wurde mit einer, gegen Col-0 rückgekreuzten Linie gestartet. In der heterozygoten F1-Nachkommenschaft der Kreuzung sollte das Fehlen der Transposon-Banden in der spezifischen PCR den vererbten Verlust der Integration nachweisen. Es konnte nach der Analyse von 110 mutmaßlich positiven Sprung-Ereignissen der heterozygoten F1-Generation keine Linie mit stabilisierter *footprint*-Mutation isoliert werden, in der das *At4CL3*-Gen unterbrochen worden wäre. Es wurden ausschließlich saubere Sprung-Ereignisse detektiert, bzw. nicht-mutagene Basentausche an der Insertionsstelle. Unter Umständen sind bis zu 1000 individuelle Linien zu untersuchen, bis ein stabiler *footprint* gefunden wird, der zu nicht-funktioneller Sequenz führt (pers. Mitteilung K. Dekker), im Anschluss daran hätte weiter die Aufreinigung des genomischen Hintergrundes zu erfolgen. Somit wurden keine alternativen Ansätze zur Stabilisierung der Linie ZI4cl3 gestartet.

Mittels der von Syngenta (TMRI) zur Verfügung gestellten Informationen der Datenbanken konnte eine *At4CL3*-Mutantenlinie in der GARLIC-Population identifiziert werden. Die molekularbiologische Charakterisierung der isolierten Linie GA4cl3 (636_B07 gi5702189) bestätigte eine einzelne Insertion von T-DNA im ersten Intron der genomischen *At4CL3*-Sequenz an Position 2221. Durch die Größe der T-DNA Insertion mit 5,5 kb war eine Nullmutation sehr wahrscheinlich.

Anhand des bereits für die Isolierung der *At4CL2*-Linie beschriebenen Schemas konnte eine putative *At4CL3*-Mutante, SL4cl3 isoliert werden (Pool 411.11). Molekularbiologische Untersuchung zeigte, dass die *At4CL3*-Mutantenlinie eine einzelne Integration des stabilisierten Transposons dSpm am Ende des ersten Exons in *At4CL3* (Position 902 der genomischen Sequenz) trug. Sequenzierung des klonierten Bereichs ergab, dass hierdurch ein artifizieller Abbruch in der kodierten Proteinsequenz erzeugt wurde. Basierend auf RT-PCR, durchgeführt mit RNA, die aus Blütengewebe einer SL4cl3- und einer Col-0-Linie isoliert wurde, wurde die Akkumulation von *At4CL3*-Transkript untersucht. In der Probe der *At4CL3*-Nullmutante konnte mit 27 Zyklen im Gegensatz zur Wildtyp-Kontrolle kein Transkript nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Segregationsanalyse zeigte Kosegregation der Insertion mit der vermittelten BASTA-Resistenz, bestätigte eine einzelne Integration und führte zu der homozygoten Linie, die Ausgangspunkt für die weiteren Analysen war.

Durchsichtung der SALK-Population ergab eine weitere putative *At4CL3*-Nullmutanten-Linie (003025). Charakterisierung der identifizierten und isolierten Linie SL4cl3 ergab eine einzelne Integration von T-DNA in der genomischen Sequenz von *At4CL3* an der Position 2492.

3.3.5 Identifizierung und Isolierung einer *At4CL4*-Nullmutante

Anhand des bereits für die Isolierung der *At4CL2*-Linie beschriebenen Schemas konnten drei Pools (42.190, 42.202 und 42.215) in der erweiterten SLAT-Population identifiziert werden, die mutmaßlich *At4CL4*-Mutanten enthielten.

Die Firma GreenTec wurde mit der Isolierung der SL4cl4-Nullmutanten aus den Pools beauftragt. Alle drei Pools wurden durchsichtet, eine positive Mutantenlinie konnte nicht isoliert werden. Hinweise auf das Vorliegen einer solchen Linie wurden aber gewonnen. Es wurden 31 mutmaßlich positive Einzellinien übergeben sowie ein Pool Samen gesammelt aus 56 Linien einer Schale, die weitere mögliche, aber nicht identifizierbare Kandidaten enthielt. Auch wurde auf Nachfrage eine Rohsequenz der mutmaßlichen Insertions-Position übergeben.

Alle 31 übergebenen mutmaßlichen *At4CL4*-Nullmutantenlinien zweier Pools erwiesen sich als falsch-positiv. Weiteren Nachkommen dieser Pools wurden nicht übergeben, da sie bereits entsorgt worden waren. Die Isolierung der Einzel-Linie wurde ausgehend vom letzten übergebenen Pool neu gestartet. Leider war eine Rückzuordnung zu den SLAT-Identifikationsnummern nicht mehr möglich, da diese Informationen nicht übergeben wurden. Es konnte eine SL4cl4-Mutante aus dem Pool isoliert und bestätigt werden. Molekularbiologische Untersuchung zeigte, dass die *At4CL4*-Mutantenlinie eine einzelne Integration des stabilisierten Transposons dSpm am Anfang des ersten Exons in *At4CL4* trug. Sequenzierung des klonierten Bereichs ergab, dass hierdurch ein artifizieller Abbruch

der kodierten der Proteinsequenz erzeugt wurde. Basierend auf RT-PCR, durchgeführt mit RNA, isoliert aus Blattgewebe einer SL4cl4- und einer Col-0-Linie, wurde die Akkumulation von *At4CL4*-Transkript untersucht. In der Probe der *At4CL4*-Nullmutante konnte mit 25 Zyklen im Gegensatz zur Wildtyp-Kontrolle kein Transkript nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Segregationsanalyse zeigte Kosegregation der Insertion mit der vermittelten BASTA-Resistenz, bestätigte eine einzelne Integration und führte zu der homozygoten Linie, die Ausgangspunkt für die weiteren Analysen war.

3.3.6 Ferulat-5-Hydroxylyase (*AtF5H*) und die *fah1-2* Mutante

In Kombination mit den *At4CL*-Mutanten wurde die *fah1-2*-Nullmutantenlinie der *AtF5H* mit in die Analysen dieser Arbeit einbezogen. *AtF5H* ist in *A. thaliana* das einzige, zu diesem Zeitpunkt bekannte Einzelkopie-Gen des Phenylpropanstoffwechselwegs mit verfügbarer Nullmutante war. Die *AtF5H* liegt im Stoffwechselweg in dem Ast, über den die Ligninvorstufen synthetisiert werden.

Da über die Art der Mutation in der *fah1-2*-Mutante keinerlei Informationen vorlagen, war es erforderlich, diese Linie zunächst auf genomischer Ebene zu untersuchen, um mögliche allgemeine Defekte regulatorischer Gene des Phenylpropanstoffwechsels auszuschließen.

Basierend auf der verfügbaren *AtF5H*-Sequenz (NCBI, GenBank) wurden Oligonukleotide synthetisiert, die den gesamten kodierenden Bereich flankieren. Mit diesen Oligonukleotiden wurden mit der PCR, ausgehend von cDNAc die Region der WT-F5H sowie die der Linie *fah1-2* amplifiziert, anschließend kloniert und sequenziert.

Es zeigte sich, dass die EMS-mutagenisierte Linie *fah1-2* eine für diese Art der Mutagenisierung typische C nach T Mutation trägt (McCallum et al., 2000), die in der Aminosäuresequenz der WT-F5H-Sequenz das Kodon für Glutamat 110 (CAA) in ein Stopkodon (TAA) verwandelt.

Folgender Ausschnitt der Sequenzen verdeutlicht die in der Linie *fah1-2* identifizierte Mutation:

F5H.Seq A GTC CTT CAA GTC Genomische Position 630 bp nach ATG

fah1-2.Seq A GTC CTT TAA GTC

Proteinsequenz V L Q->* V Proteinsequenz Position 110

Diese Mutation ist mit hoher Wahrscheinlichkeit verantwortlich für den beobachteten biochemischen Phänotyp der *fah1-2* Mutante, der in Abbildung 26 dargestellt ist.

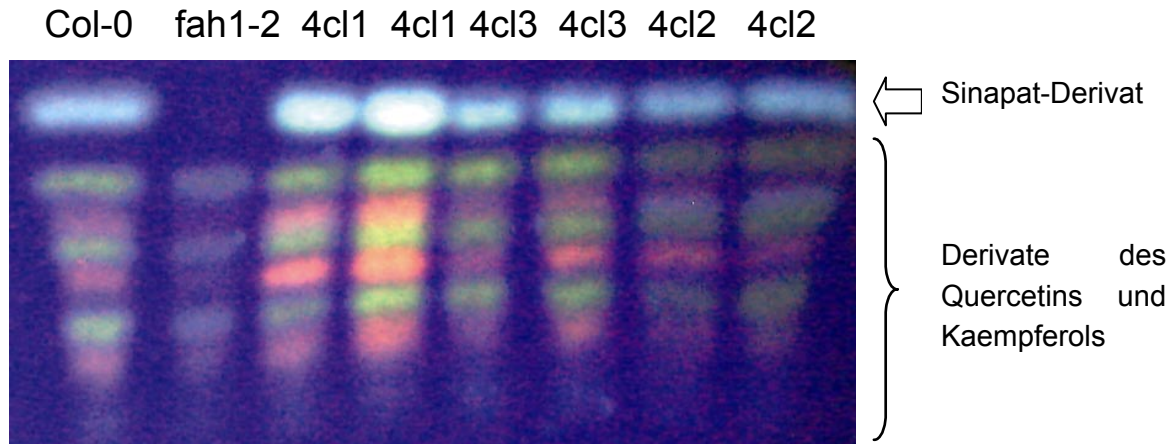


Abbildung 26: HPTLC-Analyse unterschiedlicher Mutanten des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels.

Derivate von Quercetin und Kaempferol waren durch gelbe und orange Banden erkennbar, das Sinapat-Derivat, dessen Akkumulation in allen anderen Linien durch die blaue Bande leicht zu erkennen war, fehlte vollständig in der Linie fah1-2.

3.3.7 Zimtsäure-4-Hydroxylase (*AtC4H*) und mögliche Mutantenlinien

Für das Gen der Zimtsäure-4-Hydroxylase (*C4H*) konnte in keiner der beschriebenen Insertions-Populationen eine Mutanten-Linie identifiziert werden, die auf ein nicht-funktionelles Gen hindeutete. Aufgrund der Position der *AtC4H* im allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel und der Tatsache, dass es sich um ein Einzelkopie-Gen handelt, ist dies auf einen möglich letalen Phänotyp der Nullmutante zurückzuführen. Da Insertionen von Transposon- oder T-DNA meist zu vollständigem Funktionsverlust des vom getroffenen Gen kodierten Proteins führen, war das Fehlen von *AtC4H*-Mutanten in den untersuchten Populationen plausibel. Daher bot die Durchsichtung einer EMS-generierten Mutanten-Population die Möglichkeit, schwächere Allele mit reduzierter Funktion der *AtC4H* zu identifizieren.

EMS-Mutagenisierung erzeugt häufig G/C nach A/T-Transitionen. Tritt ein solcher Übergang an der ersten Position eines Kodons auf, so ist eine hohe Wahrscheinlichkeit gegeben, dass die kodierte Aminosäure geändert wird.

Für das Gen der *AtC4H* wurden Oligonukleotide generiert, die einen 1 kb großen Bereich des ersten Exons flankieren. Diese Region ist aufgrund des hohen Auftretens von G/C-Nukleotiden an ersten Positionen von Kodons vielversprechend für eine Suche nach EMS-generierten Mutationen der Proteinsequenz.

Mit diesen Oligonukleotiden wurde vom ATP (*Arabidopsis* Tilling Project, Universität Washington) die dortige EMS-Population auf Mutationen in *AtC4H* durchsichtet. Es konnten 17 Linien mit Nukleotid-Übergängen im *AtC4H*-Gen identifiziert werden. Zwölf dieser Linien trugen Austausche, die zu keiner Änderung der Proteinsequenz führten. Weitere fünf Linien wurden identifiziert, in denen die Änderung eines Kodons eine Mutation in der Proteinsequenz von *AtC4H* bewirkte. Eine Linie trug den gesuchten Übergang eines Kodons (W126) zu einem Stopkodon. Vier dieser fünf Mutanten-Linien sind heterozygot, während

alle anderen Linien homozygot verfügbar sind. Dies unterstützt die Vermutung, eine *AtC4H*-Nullmutante könne einen letalen Phänotyp zeigen. Alle Linien wurden im Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC) bestellt, lagen aber bei Beendigung der Arbeit noch nicht vor, daher konnten diese Mutanten noch nicht bestätigt werden.

3.3.8 Übersicht der isolierten Mutanten des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht und Zusammenfassung aller durchsichteter Populationen, der Methode, die jeweils angewendet wurde sowie der identifizierten und isolierten Mutanten-Linien. Rot unterlegt sind die individuellen Linien, die für die weiteren phänotypischen Analysen eingesetzt wurden. Weitere Linien wurden im Folgenden zur unabhängigen Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse genutzt. Im Anschluss dargestellt ist eine grafische Übersicht der Positionen von T-DNA oder Transposon-DNA aller isolierten *At4CL*-Mutantenlinien (Abbildung 27). Die Positionen der Basenaustausche der EMS-mutagenisierten *AtC4H*-Linien ist nicht wiedergegeben, da diese Linien bis zum Abschluss der Arbeit noch nicht molekularbiologisch untersucht waren.

Tabelle 3: Übersicht zur Identifikation und Isolierung von Nullmutanten

Population	Durchsichtsmethode	Typ der Population	Mutanten identifiziert	Mutanten isoliert
AMAZE (MPIZ) En-1 Transposon	PCR auf Pools genomischer DNA (Reihen und Spalten) identifiziert Einzellinie	autonomes, mobiles Transposon mit 5-25 Integrationen 10.000 Linien	(1x 4CL1 , stabiler <i>footprint</i>) 3x 4CL2, Integration 1x 4CL3, Integration	Transposonfrei, 9 Rückkreuzungen --- keine stabile Linie
SLAT (J. Jones) dSpm-Transposon	Hybridisierung eines Filters, der iPCR Produkte trägt, identifiziert Pool mit 50 Pflanzen	stabil 1-2 Integrationen 60.000 Linien	2x 4CL2 Pools 1x 4CL3 Pool 4x 4CL4 Pools	stabile Linie stabile Linie stabile Linie
CSHL (R. Martienssen) Ds-Element	BLAST gegen Datenbank mit flankierenden Sequenzen identifiziert Einzellinie	<i>Gene/Enhancer-trap</i> 10.000 Linien	1x 4CL4, 1 kb stromaufwärts des ATG	---
SIGNAL (J. Ecker) T-DNA	BLAST gegen Datenbank mit Sequenz/Annotierten Zugriffsnummern identifiziert Einzellinie	1-2 Integrationen 150.000 Linien	1x 4CL3, stabile Integration	stabile Linie
GARLIC (TMRI) T-DNA	BLAST gegen Datenbank mit flankierenden Sequenzen identifiziert Einzellinie	1-2 Integrationen 98.000 Linien	1x 4CL1 stabile Integration 1x 4CL3 stabile Integration	stabile Linie stabile Linie
GABI-KAT (MPIZ) T-DNA	Sequenz/Annotierte Zugriffsnummern identifiziert Einzellinie	<i>Activation tagging</i> 12.000 Linien	---	---
ZIGIA (MPIZ) T-DNA	Sequenz/Annotierte Zugriffsnummern identifiziert Einzellinie	<i>Activation tagging</i> 8.000 Linien	---	---
ATP (University of Washington) EMS TILLING	TILLING, PCR auf genomischer Sequenz identifiziert Einzellinien	EMS Population 3.000 Linien pro Runde	Serie von 13 C4H Mutanten 3 Aminosäuretausche 1 Stopkodon	Alleliche Serie im NASC bestellt

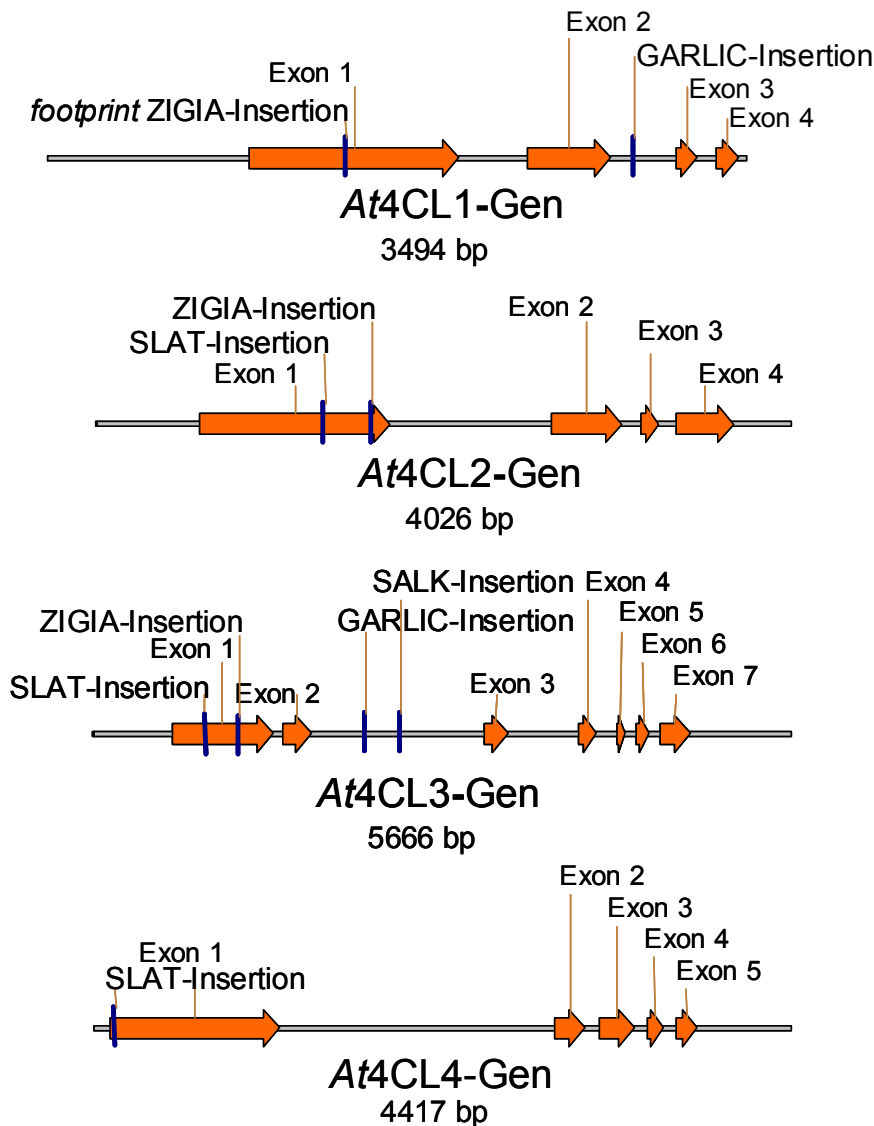


Abbildung 27: Übersicht zu allen isolierten At4CL-Mutanten mit den Positionen der Insertionen innerhalb der Gene.

Die Größenordnung der dargestellten Bereiche ist nur innerhalb jedes Gens korrekt, die Größen der Gene untereinander sind nicht maßstabgetreu wiedergegeben.

3.3.9 Segregationsanalyse zur Bestimmung der Anzahl von Integrationen

Im Durchschnitt wurden 1,2 Integrationen für die Transposon-Insertionslinien der SLAT-Population angegeben. Da für die weiteren Kreuzungen und die Interpretation der Analysen von Nullmutanten der genetische Hintergrund eine Rolle spielen kann, wurden die Mutantenlinien auf die Anzahl der Integrationen untersucht. Ein Methode zur Überprüfung der Anzahl ist die Segregationsanalyse mittels der Marker, die auf den Insertionsbereichen liegen. Hierfür wurden die homozygote Linie SL4cl2 gegen Wildtyp Col-0 zurückgekreuzt und die Nachkommen der heterozygoten F1 Linien mittels BASTA selektiert.

In der F2 wurde die für Einfachintegration erwartete Aufspaltung von 1:3 beobachtet.

Line	Anzahl Resistente	Anzahl Selektionierte	Verhältnis
Linie 1	65	20	1 : 3,25
Linie 2	17	6	1 : 2,83
Linie 3	48	17	1 : 2,82

3.4 Mehrfachmutanten

Zu Überwindung der partiell funktionellen Redundanz der isolierten *At4CL*-Nullmutanten und zur Verknüpfung mit weiteren Mutantenlinien des Phenylpropanstoffwechsels war es erforderlich, Einzelmutanten in geeigneten Kombinationen miteinander zu kreuzen. Die konventionelle Methode zur Erzeugung von Tripel-Mutanten sieht die Kreuzung zweier homozygoter, komplementärer Doppel-Mutanten vor. Da dies jedoch im gegebenen Zeitrahmen praktisch nicht durchzuführen war, wurden Mehrfachmutanten direkt durch geeignete Kombinationen heterozygoter Eltern erzeugt. Die Vererbung der Mutationen wurde durch den Einsatz von Markern (Resistenzen, morphologische Phänotypen und biochemischen Phänotypen) und molekularbiologischen Methoden (PCR, Southern-Analyse) verfolgt. Da die Erzeugung der Mutantenlinien in dieser Arbeit einen Schwerpunkt darstellte, sind in Kapitel 3.4.1 und Kapitel 3.4.2 stellvertretend die Ergebnisse zweier Kreuzungen angegeben, anhand denen die Strategien zur Isolierung und Bestätigung von Mehrfachmutanten verdeutlicht werden sollen.

Eine Übersicht der Ergebnisse aller durchgeführten Kreuzungen ist dargestellt in der folgenden Abbildung 28.

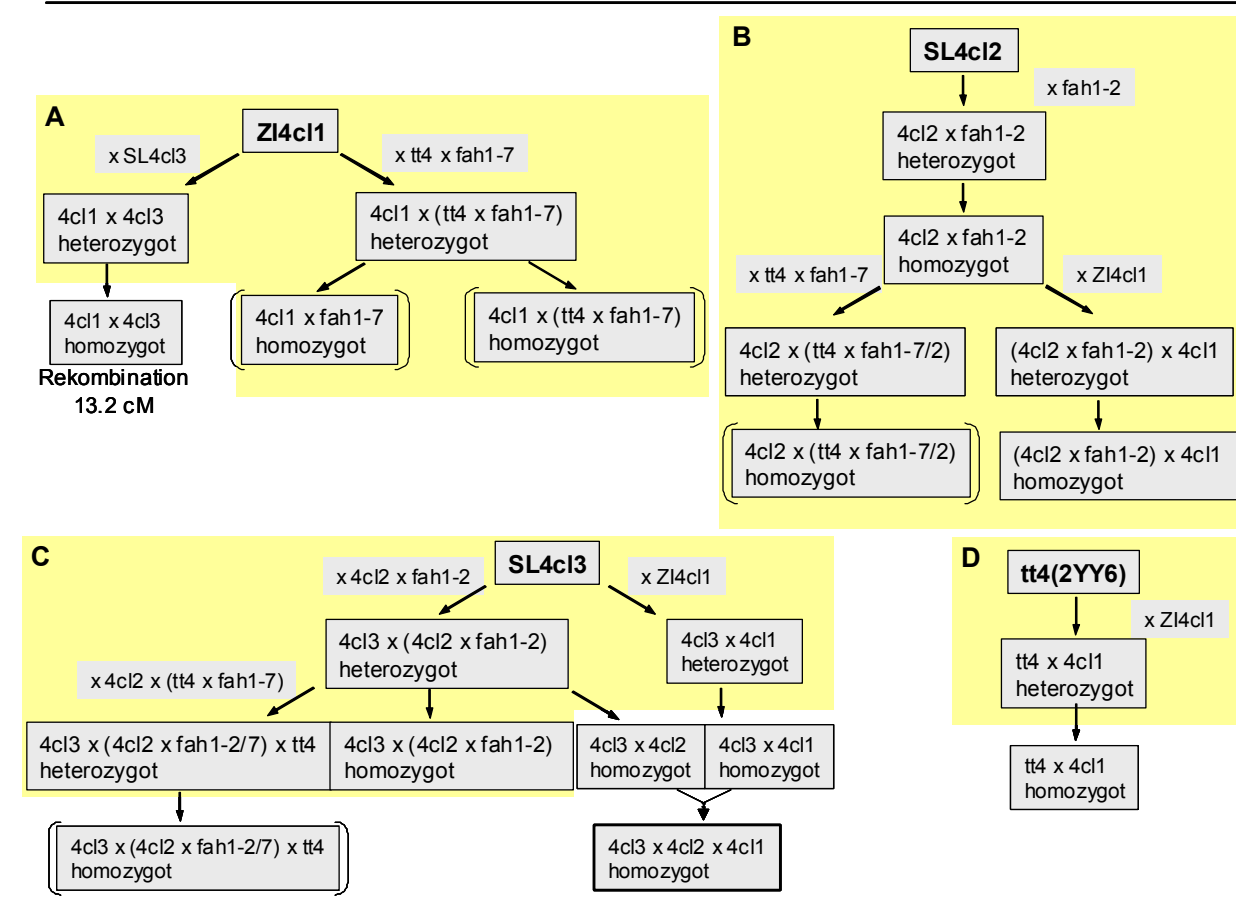


Abbildung 28: Übersicht zu den Kreuzungen der Linien ZI4cl1, SL4cl2, SL4cl3 und tt4(2YY6).

Dargestellt ist das Vorgehen zur Erzeugung mehrfacher Nullmutantenlinien basierend auf den Einzellinien. Die Nullmutantenlinien der Gene *At4CL1*, *At4CL2*, *At4CL3*, *AtF5H* und *AtCHS* wurden schrittweise durch Kreuzung miteinander kombiniert. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten und bestätigten Mehrfachmutanten sind hinterlegt. Folgend der mütterlichen Linie entspricht jede Stufe in der Darstellung einer Generation. Die Pollen-Donoren sind angegeben. Die Erzeugung der homozygoten *At4CL1/At4CL3*-Mutante erfordert ein Rekombinationsereignis der Einzelmutanten (in **A** und **C**). Linien in Klammern (in **A**, **B** und **C**) enthalten gemischte Chromosomen der Ökotypen Columbia und Landsberg *erecta*.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, konnten im Rahmen der Arbeit folgende Kombinationen homozygoter Mehrfachmutantenlinien erzeugt und molekularbiologisch bestätigt werden:

<i>At4CL1</i> :	ZI4cl1/fah1-7	ZI4cl1/fah1-2	ZI4cl1/tt4/fah1-7
<i>At4CL2</i> :	SL4cl2/fah1-2	SL4cl2/tt4/fah1-7	SL4cl2/ZI4cl1/fah1-2
<i>At4CL3</i> :	SL4cl3/SL4cl2/fah1-2.		

Weitere heterozygote Mutantenlinien liegen zu folgenden Genen vor:

<i>At4CL1</i> :	ZI4cl1/SL4cl3	
<i>At4CL3</i> :	SL4cl3/SL4cl2/fah1-(2/7)/tt4	SL4cl3/ZI4cl1
<i>AtCHS</i> :	tt4(2YY6)/ZI4cl1.	

3.4.1 Erzeugung der ZI4cl1 x SL4cl3 Doppelmutante

Die physikalische Position von Genen im *A. thaliana*-Genom ergibt sich aus der durch annähernd vollständige Sequenzierung verfügbaren physikalischen Karte. Sowohl das Gen für *At4CL1* als auch das für *At4CL3* liegen auf Chromosom I. Eine Kreuzung beider homozygoten Mutanten führt zu der heterozygoten Mischmutante in der F1-Generation, die homozygote Doppelmutante ist allerdings nicht direkt in der F2-Generation durch Selbstung zugänglich. Hierfür ist die homologe Rekombination des ersten Chromosoms während der Meiose notwendig, bei der gesamte Bereiche zwischen zwei homologen Chromatiden ausgetauscht werden.

Um die erforderliche Größe der Population an F2-Pflanzen zu ermitteln, die das gesuchte Rekombinationsereignis enthält, sind genetische Karten mit Markern hilfreich.

Daten von genetisch lokalisierten SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, Stanford Genome Center (SGC)) wurden eingesetzt, um die hier dargestellte Kartierung zu erzeugen.

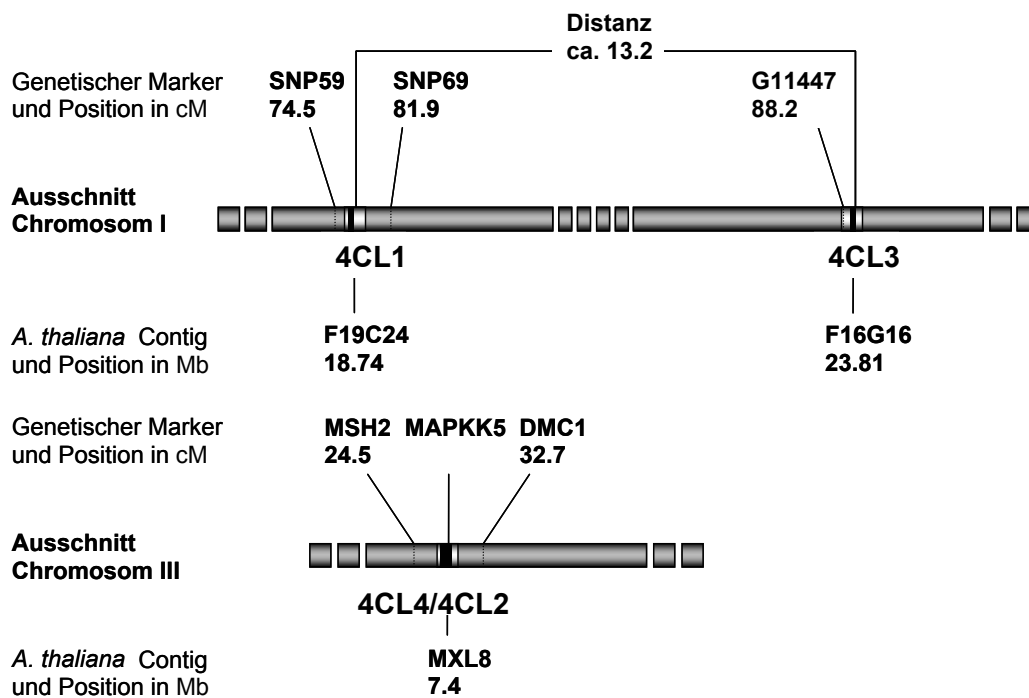


Abbildung 29: Physikalische und genetische Position der *At4CL*s.

Dargestellt ist ein Ausschnitt von Chromosom I mit den Positionen der zu *At4CL1* und *At4CL3* nächsten genetischen Marker in cM und der *A. thaliana* Contigs in Mb, die die entsprechenden Gene tragen. Die genetischen Marker wurden zur Ermittlung der genetischen Distanz genutzt. Zum Vergleich ist der Bereich mit der Position von *At4CL3* auf Chromosom III ebenfalls wiedergegeben.

Anhand der in Abbildung 29 aufgeführten Marker, die physikalisch in der Nähe der Gene *At4CL1* und *At4CL3* liegen, wurde die genetische Distanz auf ca. 13.2 cM geschätzt. Die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination ist bereits in der F2-Generation gegeben und für die Isolierung der homozygoten Doppelmutante (statistisch eine von 114,9 Pflanzen) müssen

etwa 340 Pflanzen untersucht werden, um die homozygote Doppelmutation ZI4cl1/SL4cl3 mit 95 % Sicherheit zu isolieren.

Nach der Selbstung einer einfach rekombinierten, heterozygoten Linie (eine von 9 Pflanzen der F₂-Generation) ist theoretisch in der F₃-Generation die homozygote Doppelmutante wesentlich leichter zu ermitteln.

Zur Erzeugung der Doppelmutante wurden jeweils homozygote Pflanzen beider Einzelmutanten mit Pollen der anderen Linie bestäubt. Um das weitere Vorgehen zu vereinfachen wurden zunächst F₁ Nachkommen der Kreuzung von SL4cl3 auf ZI4cl1 untersucht. Durch die Pollen der SLAT Linie wurde bei erfolgter Kreuzung das Markergen BAR auf die Nachkommenschaft übertragen. Über die so vermittelte Herbizidresistenz konnten nach Selektion mit dem Herbizid BASTA mehrere resistente Linien isoliert werden, wie in Abbildung 30 dargestellt.

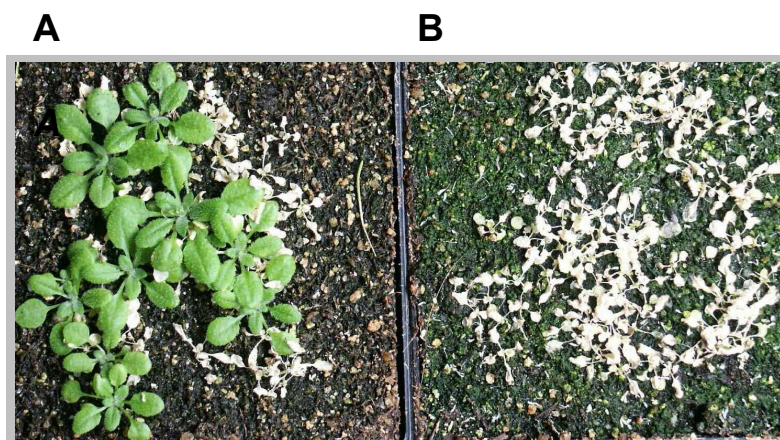


Abbildung 30: Herbizidbehandlung zur Selektion von F₁ Nachkommen einer ZI4cl1 x SL4cl3 Kreuzung.

Abgebildet sind 2 Wochen alte Keimlinge 2 Tage nach Behandlung mit dem Herbizid BASTA. Resistente Linien tragen das Resistenzgen BAR, auf die nicht-resistente Linie ZI4cl1 übertragen durch die Pollen der resistenten Linie SL4cl3. **A** F₁ Nachkommen der resistenten Linie SL4cl3 gekreuzt auf die nicht-resistente SL4cl1 Linie. Die vermittelte BASTA Resistenz zeigt erfolgreiche Kreuzung. **B** Col-0, nicht-resistenter Wildtyp.

Die Samen dieser Linien eignen sich für die oben beschriebene F₃-Suche nach der homozygoten Doppelmutante ZI4cl1/SL4cl3.

3.4.2 Erzeugung von ZI4cl1 x SL4cl2-Doppelmutantenlinien

Nach erfolgter Kreuzung und erfolgreicher Selektion BASTA-resistenter ZI4cl1 x SL4cl2, bzw. Kontrolle der Resistenz der Linien SL4cl2 x ZI4cl1 wurden die Pflanzen der F₂-Generation erneuter Selektion unterworfen. Erwartungsgemäß spaltete das Merkmal der Resistenz in der F₂ Generation mit 3:1 auf, positiv selektionierte Linien trugen somit zumindest heterozygot die Insertion in *At4CL2*.

Zur weiteren Analyse wurde genomische DNA aller individuellen Linien extrahiert und mit Hilfe von PCR der Genotyp der Pflanzen mit dem Ziel untersucht, homozygote Doppelmutanten zu identifizieren.

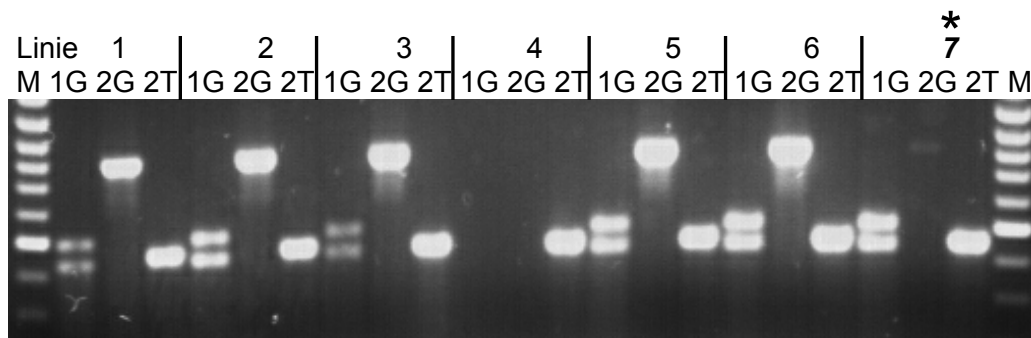


Abbildung 31: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten einer Analyse von 7 Linien der Mehrfachmutanten.

Dargestellt sind folgende Reaktionen:

- 1G, Identifizierung der ZI4cl1-Mutante durch Amplifizierung des genomischen Bereichs der die frühere Insertionsstelle überspannt, mit anschließender Restriktionsendonuklease-Behandlung. Die Excision des Transposons hinterließ ein *footprint*, der im mutagenisierten Allel die Restriktionsschnittstelle Alw26-I erzeugt.
- 2T, Identifikation der Transposon-Integration der SL4cl2 Mutante durch Amplifikation mit Gen- und Transposon-spezifischen Oligonukleotiden.
- 2G, Amplifikation des genomischen Bereichs von At4CL2 der die stabile Transposon-Integration flankiert, bei homozygoter Insertion fehlt diese Bande.

Wie in Abbildung 31 dargestellt, ließ sich anhand der PCR-Produkte der Genotyp einer Linie ermitteln. Im oben dargestellten Beispiel der F2 Nachkommen einer [ZI4cl1 x SL4cl2] x [ZI4cl1 x fah1-2]-Kreuzung (siehe Abbildung 28 und Kapitel 3.4.2) ergab sich für die abgebildeten Linien folgende Verteilung der Allele: erwartungsgemäß waren alle amplifizierten Linien homozygot für die Mutation in At4CL1, einzig Linie 4 zeigte Ausfall der PCR, fünf der 8 Linien waren heterozygot für die Insertion in At4CL2 und zwei Linien mutmaßlich homozygot. Linie 7, markiert mit einem Stern, stellte somit die mutmaßlich die gesuchte homozygote Doppelmutante dar.

3.5 Charakterisierung der Nullmutantenlinien

3.5.1 Morphologische Vergleiche und entwicklungsspezifische Untersuchungen der Einzel-Mutantenlinien

Hinweise auf mögliche Gewebe, in denen morphologische oder entwicklungsspezifische Phänotypen der *At4CL*-Nullmutantenlinien zu identifizieren sind, wurden aus den Daten der gewebespezifischen Expression (siehe Kapitel 3.2.5) gewonnen.

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden mit allen Linien durchgeführt, Schwerpunkte der *At4CL*-Nullmutantenlinien werden weiter unten erläutert.

Generelle Unterschiede in Keimung, Wachstum und der Samenbildung waren nicht erkennbar. Die Akkumulation von Biomasse, bestimmt durch Wiegen des Pflanzenfrischgewichts war im Rahmen der Messgenauigkeit vergleichbar mit Wildtyp, hier war auch durch UV-Stress oder Trockenstress keine Differenz zum Wildtyp zu messen. Unter Standardwachstumsbedingungen war keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den allgegenwärtigen biotischen Stressfaktoren zu erkennen.

Die *At4CL1*-Nullmutantenlinie *Zl4cl1*

Wie bereits zuvor auf Northern-Ebene beschrieben (Ehltling et al., 1999), konnte in dieser Arbeit durch RT-PCR bestätigt werden (siehe Kap. 3.2.5), dass die Expression von *At4CL1* im Spross dominiert. Somit wurde bei der Linie *Zl4cl1* verstärkt auf Unterschiede in der Entwicklung und Morphologie des Sprosses untersucht. Weder in dem Zeitpunkt der primär und Sekundärsprossbildung, noch im Wachstum oder der mikroskopisch erfassbaren Struktur des Sprosses war ein Unterschied zu Wildtyppflanzen zu erkennen. Im Rahmen der durchführbaren Untersuchung konnte auch keine Änderung physikalischer Eigenschaften des primären Sprosses festgestellt werden, weder in Flexibilität noch Zugfestigkeit.

Die *At4CL2*-Nullmutantenlinie *SL4cl2*

At4CL2 ist hauptsächlich in Wurzeln exprimiert und ebenso wie *At4CL1* leicht UV-induzierbar. Aufgrund der Bestätigung dieser Ergebnisse durch RT-PCR in dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt der Analyse der *SL4cl2*-Nullmutantenlinie auf die frühe bis späte Wurzelentwicklung und mögliche Unterschiede in der Entwicklung von Keimlingen unter Licht-, bzw. Dunkelbedingungen gelegt. Da die mRNA Akkumulation von *At4CL2* wie *At4CL1* durch Infektion von Pflanzen mit *P. parasitica* induzierbar ist (Ehltling, J., et al., 1999), wurden die Analysen der Nullmutante zunächst unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Keimlinge der Linie *SL4cl2* und *Col-0* wurden unter sterilen Bedingungen angezogen und das Wachstum der Wurzeln unter Licht sowie Dunkelbedingungen täglich gemessen. Die Analyse ergab keine reproduzierbaren Unterschiede im Rahmen der Messgenauigkeit. Die Wurzelentwicklung von Keimlingen der *SL4cl2* Nullmutantenlinie im Verlauf von 17 Tagen (nicht dargestellt) unterschied sich weder in Geschwindigkeit, noch in der erreichten Länge vom Wildtyp, im Beispiel anhand 4 Tage alter Keimlinge in Abbildung 32 dargestellt. Das verstärkte dunkel-induzierbare Wachstum des Hypocotyls, wie es in *Col-0* zu beobachten war, ergab auch in der *SL4cl2* Linie keine messbare Beeinträchtigung.

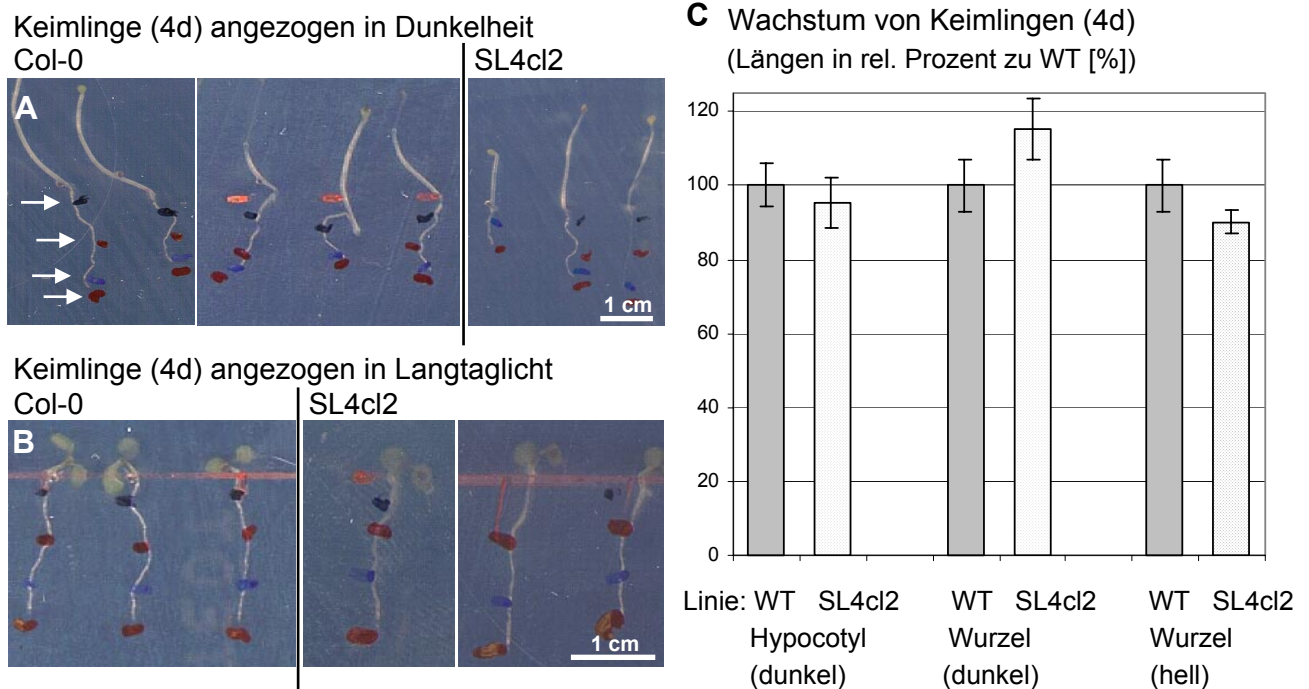


Abbildung 32: Vergleich unter Licht- und Dunkelbedingungen angezogener WT- und SL4cl2-Keimlinge.

Links abgebildet sind 4 Tage alte Keimlinge, die unter sterilen Bedingungen (**A** in Dunkelheit, **B** in Langtaglicht) angezogen wurden. Markiert mit Pfeilen ist der Wachstumsstand jeweils nach 24, 48, 72 und 96 Stunden der Keimung exemplarisch an den farbigen Markierungen der ersten Pflanze. Rechts (**C**) dargestellt sind die Mittelwerte relativen Hypocotyl- und Wurzellängen von im Dunkeln angezogenen Keimlingen sowie Wurzellängen von Keimlingen, die unter Langtaglicht angezogen wurden. Diese Werte wurden anhand von 4 Tage alten Keimlingen ermittelt, wie sie links dargestellt sind. Vermessen wurden im Schnitt 16 Keimlinge der SL4cl2 Linie und 24 Col-0 Keimlinge zweier unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren relativen Abweichung vom dargestellten Mittelwert.

Die Wurzeln von in Erde angezogenen Pflanzen unterschieden sich nicht von Col-0 Wildtyppflanzen. Sterile Flüssigkulturen hingegen zeigten nach 4-5 Wochen verstärktes Wachstum von Wurzelgewebe. Dieses System wurde in dieser Arbeit unter anderem genutzt, um Wurzeln verschiedener Linien zu miteinander vergleichen. Die *At4CL2*-Nullmutante SL4cl2 zeigte im Vergleich zum Wildtyp Col-0 keinerlei auffällige Veränderung der Keimrate, des Wachstums und des Gewichts einer durchschnittlichen Kultur. Das Erscheinungsbild der Wurzelkultur war ebenso unverändert.

Die *At4CL3*-Nullmutantenlinie SL4cl3

Die Expression von *At4CL3* wurde mit RT-PCR überprüft und fast ausschließlich in Blütengewebe detektiert. Aufgrund vorgehender Beobachtungen (Ehltling et al., 1999) wurde eine vorrangige Funktion von *At4CL3* in der Synthese aktivierter CoA-Ester für die Bildung von Blütenpigmenten sowie UV-Schutzpigmenten wie Flavonolen und Anthocyanen

postuliert. Daher wurde bei der Linie SL4cl3 verstärkt die Blütenentwicklung untersucht. Hinsichtlich des Zeitpunktes der Blütenbildung, der generellen Entwicklung und der Blütenorgane konnte kein Unterschied zu Wildtyppflanzen festgestellt werden. Ein morphologischer Phänotyp konnte nach der Befruchtung und in den Samenanlagen ebenfalls nicht festgestellt werden. Die weitere Samenentwicklung verlief identisch zu der von Wildtyppflanzen.

Mutationen die zu Reduktion des Gehalts an Flavonoiden führen, wurden in *A. thaliana* zumeist über geänderte, hellere Samenfarben isoliert. Die Samenschale (*testa*) nimmt mit der Reifung der Samen durch die Oxidation von eingelagerten Flavonoid-Pigmenten eine braune Färbung an. Eine Aufhellung der Pollen der Linie SL4cl3 wie in der als Kontrolle verwendeten tt4(2YY6) CHS-Nullmutante war jedoch nicht zu beobachten (Abbildung 33).

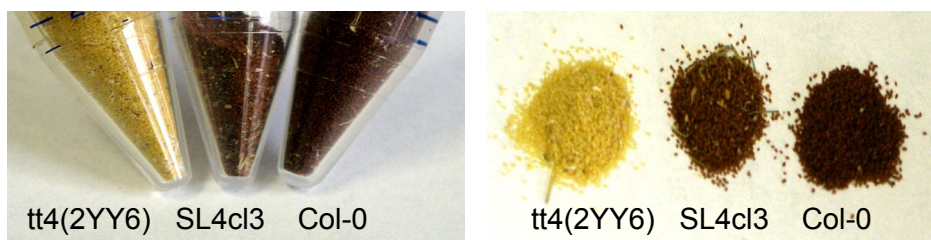


Abbildung 33: Färbung der Samenschale durch Oxidierung eingelagerter Flavonoide.

Dargestellt sind Samen der vollständig Flavonoid-Defizienten *At*CHS-Nullmutante tt4(2YY6), der *At*4CL3-Nullmutante SL4cl3 und Wildtypsamen, Col-0.

Die Samenfarbe der *At*4CL3-Nullmutante SL4cl3 zeigte keine oder kaum Unterschied zu Wildtyp Col-0 Samen. Die fehlende Färbung der CHS-Nullmutante tt4(2YY6) verdeutlicht durch den starken Kontrast den Phänotyp, der in der *At*4CL3-Nullmutante SL4cl3 praktisch nicht ausgeprägt ist.

Eine mögliche Reduktion an Flavonoiden verringert unter Umständen den Gehalt an UV-absorbierenden Schutzpigmenten. Daher wurde ein weiterer morphologischer Schwerpunkt der Analyse der *At*4CL3-Nullmutante SL4cl3 die Untersuchung der Reaktion auf erhöhten UV-Stress. Col-0 und SL4cl3 Pflanzen wurden entweder in einem Lichtschrank für 24 Stunden permanentem UV-Licht-haltigem Weißlicht ausgesetzt oder in einer UV-Box für kurze Perioden mit einer hohen Dosis kurzwelliger UV-Strahlung behandelt. Kontrollpflanzen wurden gleichen Bedingungen, nicht aber dem Strahlungsstress ausgesetzt.

Stressbedingte Akkumulation von sichtbaren Pigmenten in vegetativem Gewebe war sowohl beim Wildtyp als auch bei den *At*4CL3-Nullmutanten zu beobachten. Die Abnahme der Biomasse, bestimmt durch Wiegen des Frischgewichts von Keimlingen, war gleich zwischen Wildtyp und den *At*4CL3-Nullmutanten und am ehesten auf die reduzierte Luftfeuchtigkeit im Lichtschrank zurückzuführen.

Die *At*4CL4-Nullmutantenlinie SL4cl4

*At*4CL4 wurde im Laufe dieser Arbeit identifiziert, isoliert und enzymbiochemisch charakterisiert. Die Expressionsdaten deuten auf schwache Expression in allen oberirdischen Teilen der Pflanze hin. Da aufgrund dieser Informationen Vorhersagen über

Gewebe, in denen die *At4CL4*-Aktivität essentiell notwendig ist, nicht zu treffen waren, wurde die *At4CL4*-Nullmutante SL4cl4 anhand des oben beschriebenen Vorgehens auf Änderungen in der Entwicklung und Morphologie untersucht.

Im Vergleich zu Wildtyppflanzen konnten in keinem Stadium der Entwicklung der SL4cl4 Linie auffällige Unterschiede festgestellt werden.

3.5.2 Morphologische Vergleiche und entwicklungsspezifische Untersuchungen einer ausgewählte Mehrfachmutanten-Linie: Charakterisierung der *At4CL1/At4CL2*-Doppelnullmutante

Eine umfangreiche Untersuchung aller in dieser Arbeit hergestellten Mehrfachmutanten-Linien war im Rahmen der Arbeit nicht möglich. Daher wurde, wie im folgenden beschrieben, der Schwerpunkt der Analysen beispielhaft auf segregierende Populationen mehrerer heterozygoter Linien von Z14cl1/SL4cl2/fah1-2-Nullmutanten gelegt. Dies wurde auch dadurch begründet, dass die Segregation dieser Linien die Kombination homozygoter *At4CL1/At4CL2*-Doppelnullmutanten-Linien anscheinend benachteiligte.

Erste Versuche zur Isolierung der homozygoten Tripel-Mutante scheiterten, es konnte keine Linie identifiziert werden. Ein weiterer Ansatz verwendete eine Population, in der alle drei Gene heterozygot das Mutanten-Allel trugen. Es sollte daher nur eine Frage der Statistik sein, die richtige Linie zu identifizieren (theoretisch 1/64, ca. 180 Einzelpflanzen für 95% Sicherheit). Diese segregierende Population wurde im Vergleich zu früheren Ansätzen sehr früh genotypisch untersucht und es konnten tatsächlich zwei Linien identifiziert werden, in denen alle drei Allele homozygot mutiert vorlagen. Zu dem Zeitpunkt der Samenreife zeigte sich, dass genau diese beiden Linien aus zu diesem Zeitpunkt unbekanntem Grund keine Samen gebildet hatten und auch in der Entwicklung zurückgeblieben waren, während alle heterozygoten Linien eine normale Entwicklung zeigten.

Diese Beobachtung ist in Abbildung 35 dokumentiert (die Reihenfolge der Abbildungen entspricht der Entwicklung der Pflanzen, um den Phänotyp besser zu verdeutlichen und nicht der chronologischen Abfolge). Trotz des Verlusts der beiden homozygoten Linien konnten in dieser Population Linien identifiziert werden, die mindestens eines der untersuchten Gene homozygot als Nullmutante trugen, während die Anderen heterozygot vorlagen. Nachkommen dieser Linien wurden erneut ausgebracht, um entweder einen Phänotyp zu beobachten oder Samen der hier statistisch häufigeren (1/16, bzw. ¼ in der Verteilung) Tripel-Mutante zu erhalten. Um die Verbindung der Doppelnullmutation Z14cl1/SL4cl2 mit dem beobachteten Phänotyp zu untermauern, wurden diese Linien ausgebracht und der Genotyp über PCR bestimmt (Abbildung 34A). Es zeigte sich, dass die Entwicklung der segregierenden Linien bis zum Alter von etwa 4-5 Wochen normal verlief, was die Identifizierung der Mutanten erlaubte. Die mutmaßlich positiven Linien homozygoter *At4CL1/At4CL2*-Doppel-Nullmutanten sowie *At4CL1/At4CL2/fah1-2*-Tripel-Nullmutanten-Linien wurden über den gesamten Zeitraum beobachtet, um eine mögliche Schwelle zu identifizieren, an der ein Phänotyp auftritt.

Im Alter von etwa 5-6 Wochen stagnierte die Entwicklung der homozygoten Mutanten-Linien (Abbildung 34B), Wachstum über dieses Stadium hinaus konnte nicht beobachtet werden. Es fand weiter eine normale Blütenbildung statt, Schoten wurden jedoch kaum und wenn,

dann auffallend verkürzt ausgebildet. Während bei Wildtyp-Linien und den heterozygoten Segreganten die Samenbildung und Reifung einsetzte, zeigte sich keinerlei Änderung des Phänotyps der homozygoten Linien. Im Alter von etwa 12 Wochen trat in allen Linien Seneszenz ein, bis zu diesem Zeitpunkt konnten noch keine reifen Samen der homozygoten Linien geerntet werden (Abbildung 35). Die Wurzelentwicklung in der Doppelmutante war auch deutlich reduziert in Vergleich zu Wildtyp-Linien. Dies kann jedoch ein indirekter Effekt der grundsätzlich kleineren Pflanzen sein.

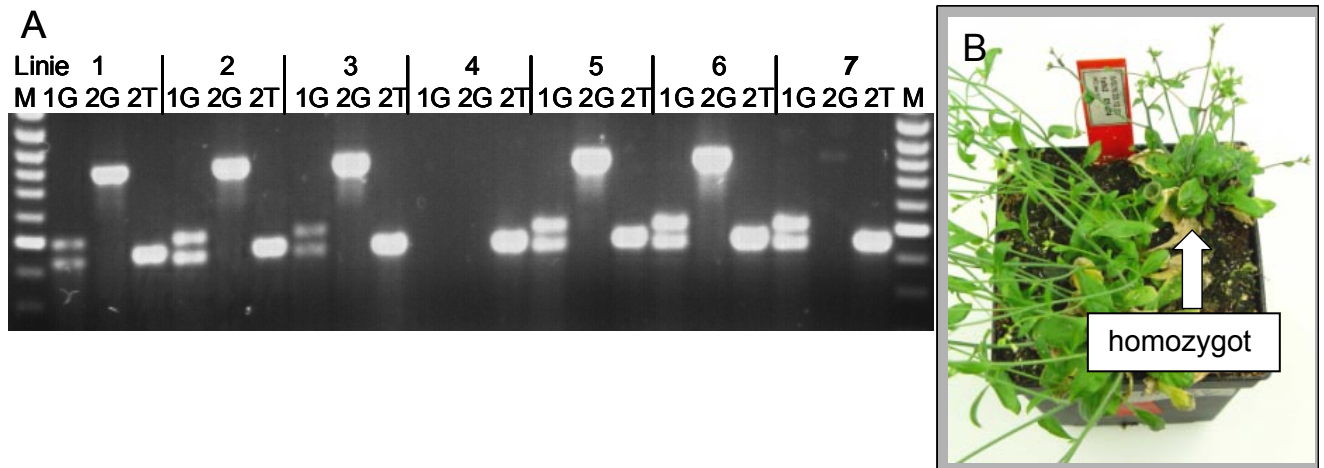


Abbildung 34: Genotypen und Phänotypen einer segregierenden ZI4cl1/SL4cl2/fah1-2-Population (Alter 6 Wochen).

A Eine PCR wurde durchgeführt zur Analyse des Genotyps von sieben Nullmutanten-Linien, dargestellt sind jeweils mit 3 Reaktionen:

-1G, Amplifikation und Restriktions-Fragmente des genomischen *At4CL1*-Bereichs, der den *footprint* mit der spezifischen ALW26I-Schnittstelle trägt sind dargestellt. Ebenso die Reaktion

-2G, Amplifikation des genomischen Bereichs, der die SL4cl2-Transposon-Insertionsstelle überspannt.

-2T zeigt Amplifikation mit Transposon- und *At4CL2*-spezifischen Oligonukleotiden.

B Phänotyp einer 6 Wochen alten homozygoten ZI4cl1/SL4cl2-Doppel-Mutante im Vergleich zu weiteren, heterozygoten Mitgliedern der Population.

ZI4cl1 x SL4cl2 x fah1-2

D6(HZ/WT/--) D7(HZ/HZ/nb) D9,D0(HO/HO/--)

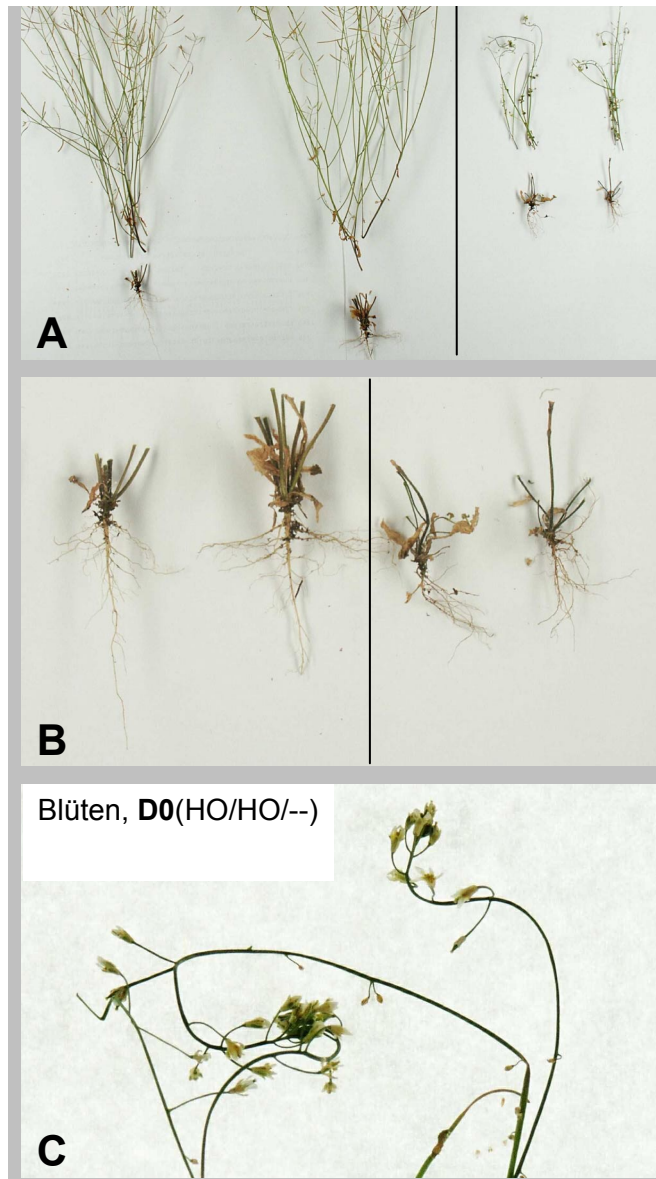


Abbildung 35: 12 Wochen alte F2-Nachkommen einer segregierenden ZI4cl1/SL4cl2/fah1-2-Population.

Abgebildet sind 4 verschiedene Linien (D6, D7, D9 und D0), die mittels HPTLC und PCR analysiert wurden. Der Genotyp ist in Klammern angegeben. **A** Gegenüberstellung der ober- und unterirdischen Teile der Pflanzen. **B** Nahdarstellung der Wurzeln. **C** Nahdarstellung von Blüten der Linie D0.

3.6 Biochemische Charakterisierung der *At4CL*- Einzelnullmutanten

Da die Einzelmutanten-Linien der *At4CLs* keinen direkt erkennbaren morphologischen Phänotyp zeigten, wurden die Auswirkungen der Nullmutationen auf biochemischer Ebene untersucht.

3.6.1 Das *At4CL1*-Gen: Untersuchung der Nullmutante *ZI4cl1*

Die von J. Hagemeier aus der ZIGIA-Population isolierte *At4CL1*-Nullmutante *ZI4cl1* wurde im Rahmen früherer Untersuchungen bereits mit HPLC auf Änderungen des Metaboliten-Musters löslicher Komponenten des Sprosses untersucht. Obwohl eine Reduktion der 4CL-Gesamt-Enzymaktivität im Spross auf 10% bereits gezeigt wurde (J. Hagemeier, Dissertation 1999), zeigte die *ZI4cl1*-Nullmutante ein dem Col-0 Wildtyp vergleichbares Muster.

Neben dem Spross ist die Expression von *At4CL1* ebenfalls in Wurzeln von nicht-steril, auf Erde angezogenen Pflanzen nachweisbar (Ehltig et al., 1999), obwohl *At4CL2* hier die konstitutiv vorherrschende Isoform darstellt. Die stark Torf-haltige Erde mit hohem Gehalt an Tanninen erschwerte die Analyse löslicher Komponenten in Wurzeln von *At4cl1* Pflanzen. Daher wurden *At4CL1*-Nullmutanten parallel zu der Analyse von *At4CL2*-Nullmutanten in Flüssigkultur angezogen und die Sekundärmetaboliten-Muster methanolischer Extrakte mit ebenfalls kultivierten Col-0 verglichen.

Bei der HPLC-Analyse methanolischer Extrakte von löslichen Sekundärmetaboliten zeigte sich, dass im Profil der *At4CL1*-Nullmutante ein zusätzlicher Peak auftrat. Verglichen mit der Gesamtmenge an extrahierten Metaboliten entsprach die Akkumulation dieser Verbindung, die nicht in der Linie Col-0 und nicht in den *At4CL2*-Nullmutanten zu detektieren war, nur einer Spurenmenge (Abbildung 36A). Vergleiche des UV-Spektrums der Verbindung mit einer Spektren-Bibliothek bereits verwendeter Standards und identifizierter löslicher Sekundärmetabolite zeigte, dass die Absorptionsmaxima mit denen von Cumarin sehr ähnlich sind, jedoch trat im UV-Spektrum der Verbindung A eine zusätzliche Schulter bei höherer Wellenlänge auf. Dies deutet darauf hin, dass es sich um eine gemeinsame Substanzklasse handeln kann, A jedoch ein Derivat der Verbindung Cumarin darstellt. Bei der niedrigen Konzentration der Verbindung A ist auch nicht auszuschließen, dass hier eine weitere Substanz mit annähernd gleicher Retentionszeit eine Überlagerung zweier Peaks, und damit die im UV-Spektrum beobachtete Schulter verursacht (Abbildung 36B).

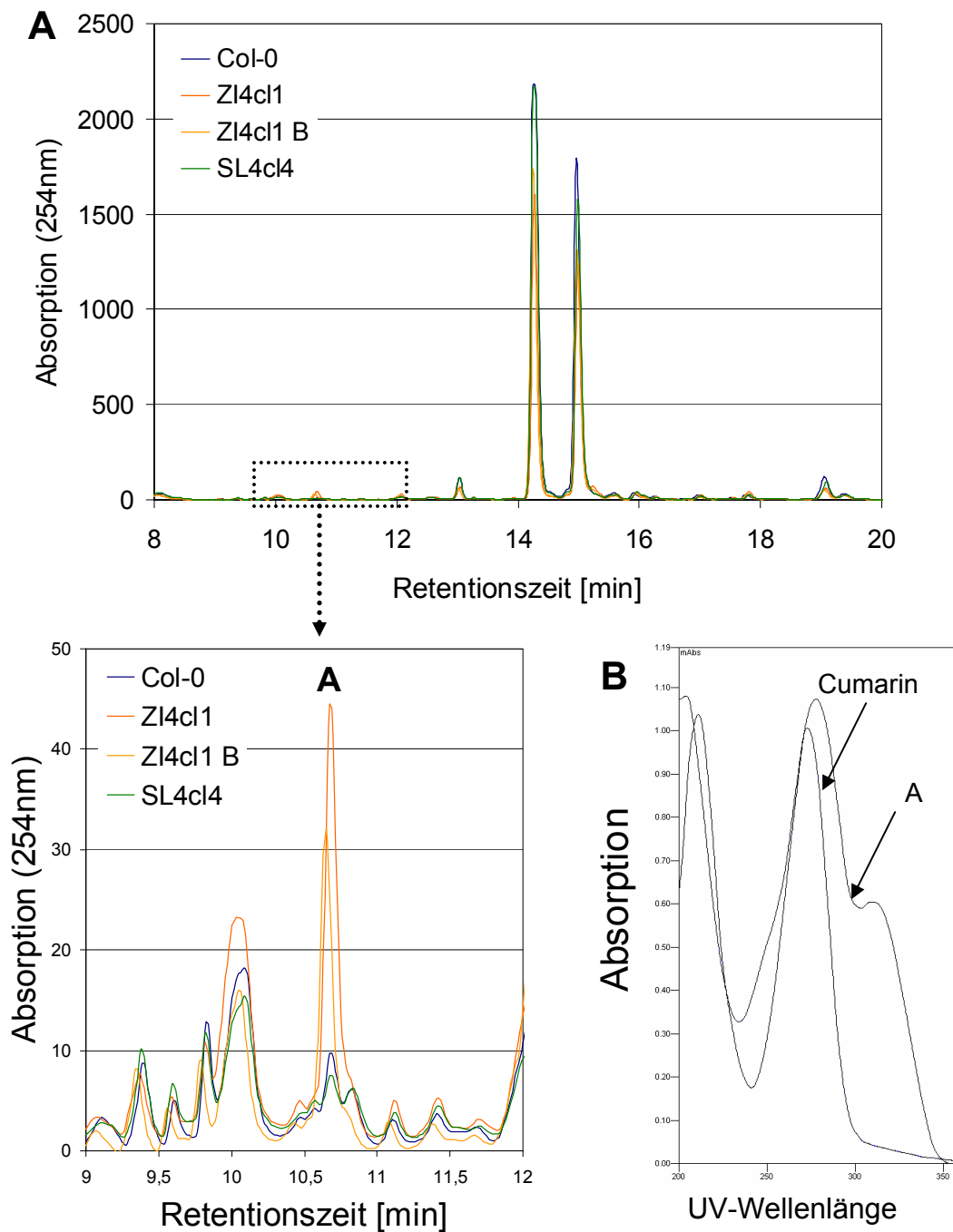


Abbildung 36: Unterschiede in den Mustern löslicher Sekundärmetabolite der Zl4cl1 und Col-0.

In Flüssigkultur angezogene Wurzeln von Col-0, der *At4CL1*-Nullmutante Zl4cl1 und der *At4CL4*-Nullmutante SL4cl4 wurden nach vier Wochen geerntet und methanolische Extrakte löslicher Sekundärmetabolite aus dem Gewebe hergestellt. **A** Die Extrakte wurden über HPLC aufgetrennt und analysiert. Dargestellt ist in der Übersicht das Profil einer Col-0-Linie, zweier SL4cl1-Nullmutanten und zum Vergleich das Profil der SL4cl4-Nullmutante. Der zweite Teil entspricht einer Ausschnittsvergrößerung des markierten Bereichs. **B** Vergleich des UV-Spektrums der Verbindung A mit dem

Spektrum von Cumarin. Aus technischen Gründen ist die Beschriftung verkleinert dargestellt, der Bereich deckt die Wellenlängen von 200 bis 350 nm ab.

Neben einer schlecht reproduzierbaren Reduktion der beiden prominentesten Peaks von Coniferin und Syringin (P. Bednarek, MPI für Züchtungsforschung, unveröffentlichte Strukturaufklärung) in Extrakten der *At4CL1*-Nullmutante konnte in dieser Linie spezifische Akkumulation mindestens einer weiteren Komponente beobachtet werden. Nach Vergleich der UV-Spektren wurde spekuliert, dass Verbindung A (Abbildung 36) möglicherweise Cumarin-Derivaten zugeordnet werden könnte.

Diese Untersuchung wurde mit zwei unabhängigen *Z14cl1*-Kulturen durchgeführt, von denen jeweils zwei getrennte Extraktionen und Analysen durchgeführt wurden. Als Kontrolle dienten Extrakte einer *Col-0*-Kultur und weiterer zwei *SL4cl4*-Linien.

3.6.2 Das *At4CL2*-Gen: Untersuchung der Nullmutante *SL4cl2*

Wie in Abbildung 23 (Kapitel 3.2.5, Seite 85) gezeigt, dominiert *At4CL2*-Expression in Wurzelgewebe steril angezogener Flüssig-Kulturen. Dies deckt sich mit den Resultaten gewebespezifischer Northern-Analysen (Ehltling et al., 1999). Aus diesem Grund wurden methanolische Extrakte löslicher Sekundärmetabolite sowie Extrakte aus hydrolysierten Zellwandfraktionen von Wurzeln mittels HPLC untersucht. Eingesetzt wurden hierfür steril angezogene Wurzelkulturen von *SL4cl2*- sowie *Col-0*-Linien.

Es konnte gezeigt werden, dass weder in der löslichen Fraktion der Sekundärmetabolite, noch in den Extrakten hydrolysierter Zellwände reproduzierbare Unterschiede zwischen *SL4cl2* und *Col-0* auftraten.

Dies ist unter Umständen auf die vorherrschenden Wachstums-Bedingungen zurückzuführen, unter denen *At4CL1* zu *At4CL2* partiell redundant aktiv sein kann. *At4CL2* könnte hierdurch funktionell ersetzt werden. Induzierte Akkumulation von *At4CL2*-mRNA nach Pathogen-Infektion von Pflanzen wurde bereits früher gezeigt (Ehltling et al., 1999). Daher wurden in einem weiteren Ansatz zur Untersuchung des biochemischen Phänotyps der *SL4cl2* parallel angezogene Wurzelkulturen von *At4CL2*-Nullmutanten- und *Col-0*-Wildtyp-Linien mit dem Pathogen *P. sylvaticum* behandelt.

Weder in der löslichen, methanolischen Fraktion der Sekundärmetabolite, noch in den Extrakten hydrolysierter Zellwände von Wurzelgewebe konnten reproduzierbare Unterschiede zwischen *SL4cl2* und *Col-0* nachgewiesen werden. Ebenso wurde im Medium der Kulturen kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt. Unterschiede Profile sekretierter Verbindungen oder von Metaboliten, die aus infizierten und bereits abgestorbenen Zellen herausgelöst wurden, waren in der Pflanze-Pathogen-Interaktion nicht nachzuweisen.

Unterschiede in Blättern von *At4cl2*-Nullmutanten- und *Col-0*-Wildtyp-Linien konnten ebenfalls nicht festgestellt werden.

3.6.3 Das *At4CL3*-Gen: Untersuchungen an Nullmutanten

Die Position der *At4CL3* im Modell des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels und die umfangreichen phylogenetischen Daten legten nahe, dass die vorrangige Funktion der *At4CL3* in der Synthese von Vorläufern des Flavonoid-Stoffwechsels besteht. Daher wurde für die Nullmutanten dieses Gens ein offensichtlicher Phänotyp erwartet, der dem Phänotyp der *tt4(2YY6)* *transparent testa* Nullmutante der *AtCHS* mit fehlenden Samenpigmenten ähnelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *At4CL3*-Mutante *ZI4cl3* aus der ZIGIA-Population isoliert. Es handelte sich jedoch nicht um eine Nullmutante, da in RT-PCR-basierenden mRNA-Analysen gezeigt werden konnte, dass mRNA des *At4CL3*-Gens in der *ZI4cl3*-Linie in einigen Proben schwach vorhanden war (Daten nicht gezeigt, da schwache Reproduzierbarkeit). Dies beruht auf der Natur der nicht-stabilen, mobilen Insertion des autonomen Transposons *En-1*. Frequenz und Art der Excisions-Ereignisse sind nicht vorhersagbar und finden unter unterschiedlichsten Bedingungen statt.

Obwohl es durch den Umfang der dafür erforderlichen Arbeiten nicht möglich war, eine stabile *footprint*-Mutante dieser Linie zu isolieren, wurden Nachkommen für erste biochemische Untersuchungen genutzt.

HPTLC-Untersuchungen mit methanolischen Extrakten aus Blättern verschiedener Linien, einschließlich der *ZI4cl3*, wurden durchgeführt, da hierüber starke quantitative Unterschiede in den Mustern von Flavonoiden - Quercetin- und Kaempferol-Glykoside und

-nichtglykosylierte Derivate - zugänglich sind (Abbildung 26, Kapitel 3.3.6, Seite 95).

Da keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen der *At4CL3*-Mutante und Kontroll-Linien nachgewiesen wurden, war der nächste Schritt die Erhöhung der Genauigkeit und die Wahl geeigneter Bedingungen, um einen möglichen Phänotyp aufzuzeigen.

Hierfür wurden 10 Tage alte Keimlinge der Linien *ZI4cl3* und *Col-0* nach 48-stündiger Dunkel-Adaption mit UV-Licht behandelt. Kontrollen wurden unter den gleichen Bedingungen, aber im Dunkeln gehalten. In den löslichen methanolischen Extrakten der *Col-0* Wildtyp-Linien konnte reproduzierbar starke Akkumulation eines Kaempferol-Derivats nach der Bestrahlung im Vergleich zu der Dunkel-Kontrolle nachgewiesen werden. In den dunkel-kultivierten *ZI4cl3*-Linien waren die Niveaus der Flavonoide (Quercetin- und Kaempferol-Derivate) der Wildtyp-Kontrolle vergleichbar, es war keinerlei, durch die Mutation erzeugte Reduktion in Flavonoiden sichtbar. Die in den Kontroll-Linien auftretende Akkumulation der UV-Schutz-Pigmente blieb jedoch in der *At4CL3*-Mutante aus, es konnte keine Änderung der Menge des beobachteten, prominentesten Kaempferol-Glykosids nachgewiesen werden, wie in folgender Abbildung 37 dargestellt.

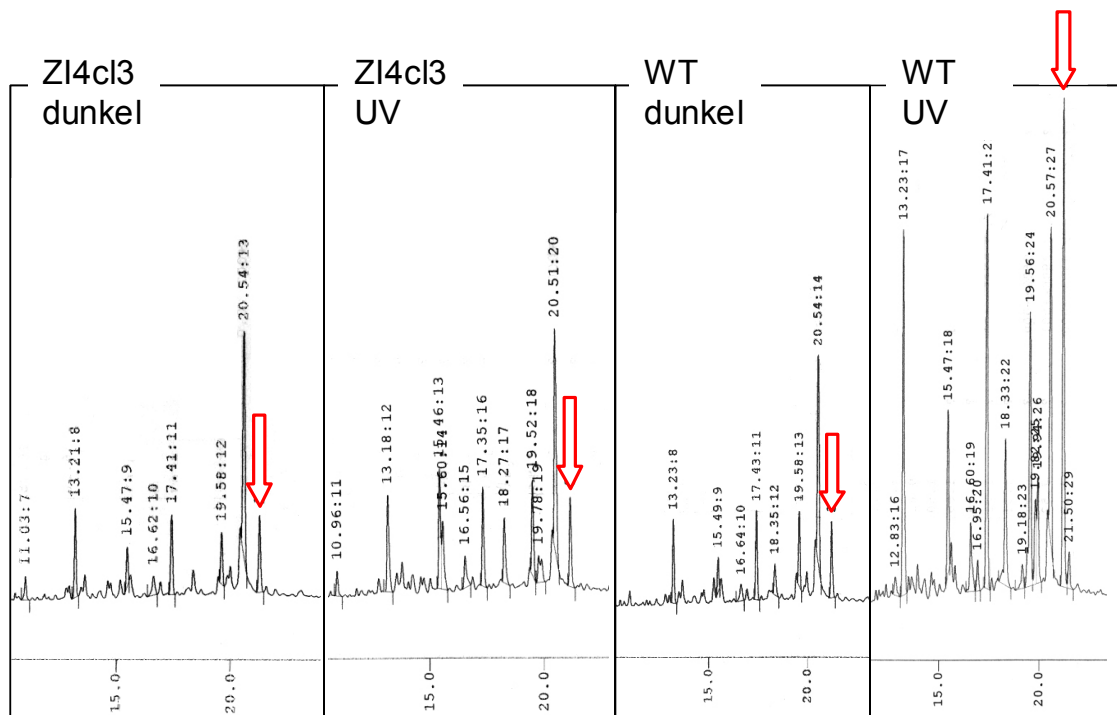


Abbildung 37: Sekundärmetaboliten-Muster von UV-bestrahlten Col-0- und ZI4cl3-Keimlingen und ihrer unbehandelten Kontrollen.

Die Ausschnitte zeigen repräsentative HPLC-Profile (Absorption bei 254 nm dargestellt gegen Retentionszeit [min]) löslicher Sekundärmetabolite. 10 Tage alte Keimlinge der Linien Col-0 und ZI4cl3 wurden nach einer 48-stündigen Dunkel-Adaption entweder mit UV-Licht bestrahlt oder weiter im Dunkeln gehalten. Von jeweils zwei unabhängigen Proben wurden getrennt zwei methanolische Extrakte 12 Stunden nach Behandlung hergestellt und mittels HPLC aufgetrennt und analysiert. Der Pfeil markiert eines von mehreren Kaempferol-Derivaten.

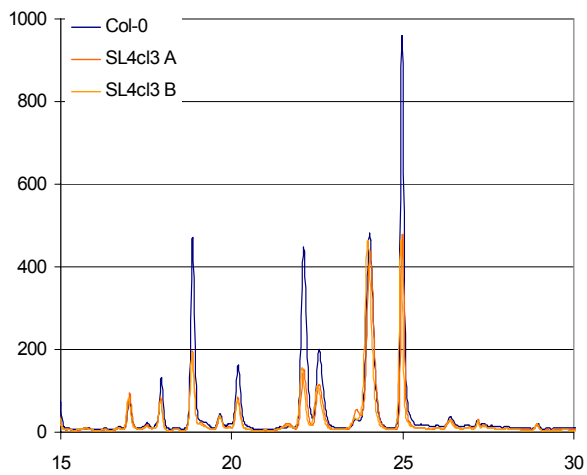
Wie zuvor gezeigt, scheint die Isoform *At4CL3* zumindest für die lichtabhängige Synthese aktivierter Vorstufen für die Akkumulation von Flavonoiden verantwortlich zu sein, während eine geringe Menge an Flavonoiden *At4CL3*-unabhängig synthetisiert wird. Dies ist wahrscheinlich der Grund, dass für die *At4CL3*-Mutante ZI4cl3 der erwartete *transparent testa*-Phänotyp ausblieb, wie es in (Abbildung 33, Kapitel 3.5.1, Seite 105) dargestellt ist. Durch die Aktivität des mobilen Transposons erzeugte revertante Sektoren, mit funktioneller *At4CL3* in einigen Geweben, würde hingegen zu einer Verteilung führen. Vereinzelt müssten Samen mit *tt*-Phänotyp auftreten.

Auf tiefere Analysen der ZI4cl3-Mutante wurde aus oben genannten Gründen verzichtet, da im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine stabile Insertions-Linie mit einer einzelnen Integration für *At4CL3* aus der erweiterten SLAT-Population isoliert werden konnte. Diese im Folgenden als SL4cl3 bezeichnete Nullmutante lag allen weiteren biochemischen Analysen sowie den Kreuzungen zur Herstellung von Mehrfach-Mutanten zugrunde.

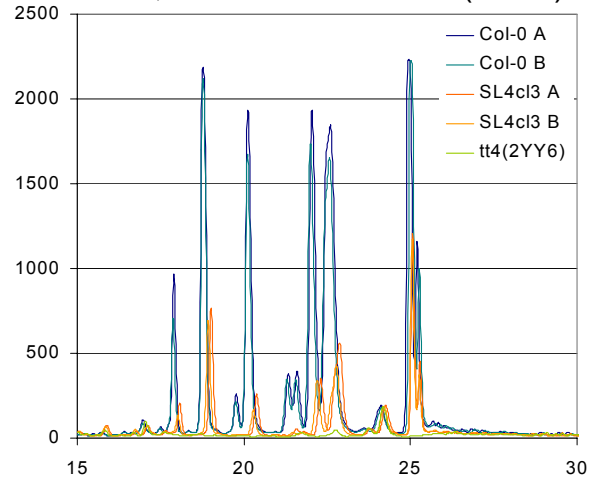
Um die Funktion der *At4CL3* und der von dieser Isoform abhängigen Sekundärmetaboliten in der Entwicklung von *A. thaliana* zu untersuchen, wurden umfangreiche Vergleiche löslicher Sekundärmetabolite verschiedener Organe zwischen Col-0 und SL4cl3 durchgeführt.

Im Laufe der Entwicklung der Pflanzen ist es möglich, dass Flavonoiden verschiedenste Funktionen zukommen, eine differenzierte Regulation des Flavonoid-Biosynthesewegs wurde daher angenommen. Aus diesem Grund wurden ebenfalls Pflanzen-Gewebe unterschiedlicher Entwicklungsstadien der *At4CL3*-Nullmutante und der Wildtyp-Linie miteinander verglichen, um eine Funktion der *At4CL3* in Abhängigkeit der Entwicklung nachzuweisen. In Abbildung 38 dargestellt sind repräsentative HPLC-Profile methanolischer Extrakte löslicher Sekundärmetabolite.

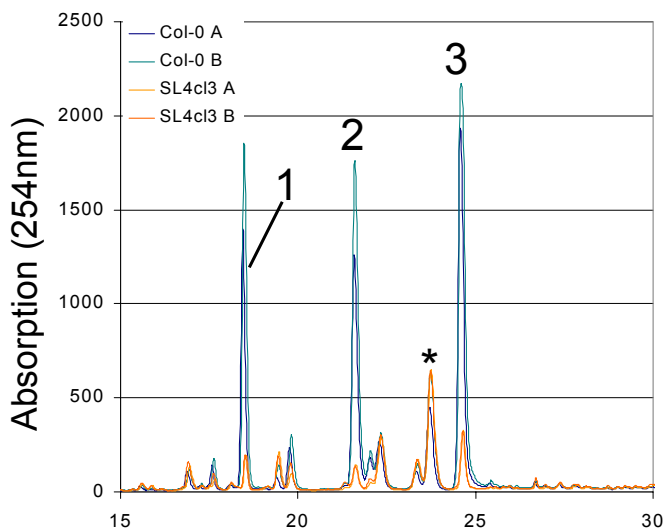
12 Tage alte Keimlinge, Col-0 – SL4cl3



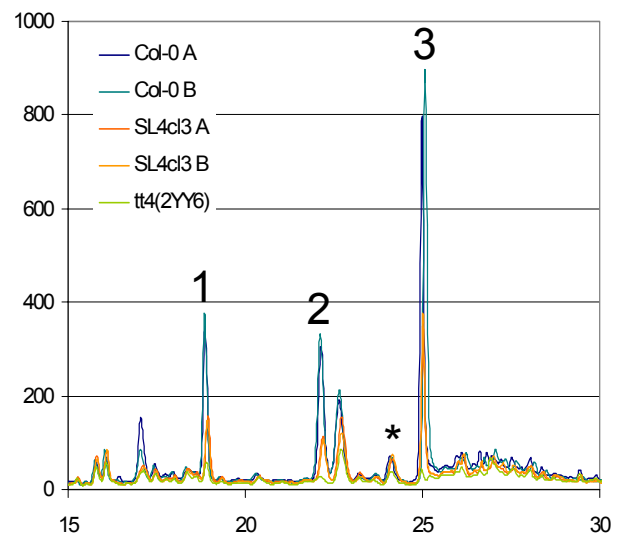
Blüten, Col-0 – SL4cl3 – tt4(2YY6)



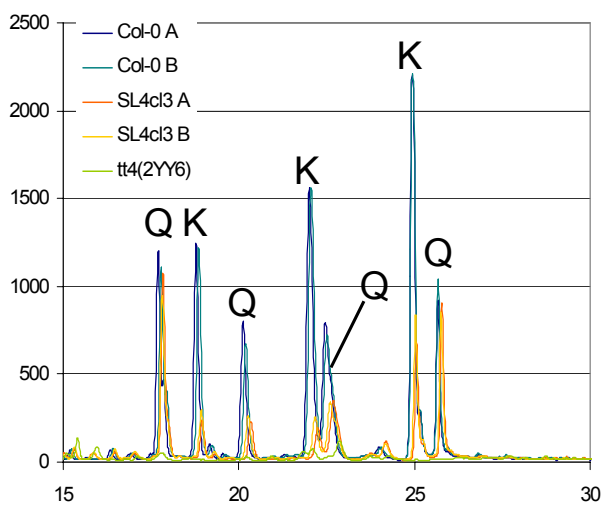
Junge Blätter, Col-0 – SL4cl3



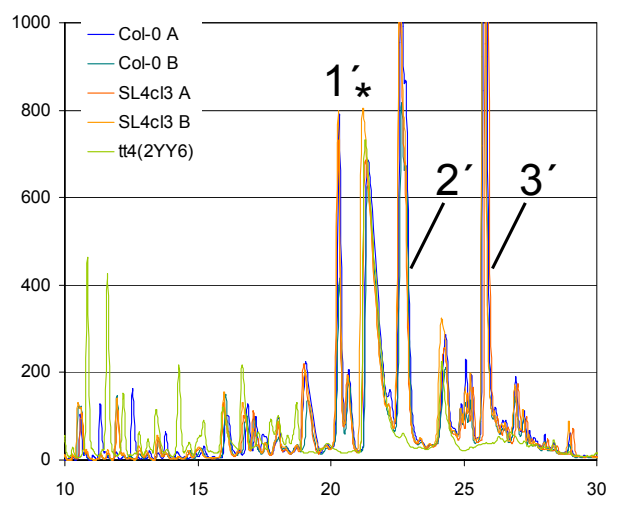
Senescente Blätter, Col-0 – SL4cl3 – tt4(2YY6)



Junge Schoten, Col-0 – SL4cl3 – tt4(2YY6)



Reife Samen, Col-0 – SL4cl3 – tt4(2YY6)



Retentionszeit [min]

Die Beschriftung der Abbildung ist auf der folgenden Seite wiedergegeben.

Abbildung 38 (auf voriger Seite): HPLC-Profile methanolischer Extrakte löslicher Sekundärmetabolite verschiedener Col-0-, SL4cl3- und tt4(2YY6)-Organe.

Zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurden Pflanzen-Organe geerntet und lösliche Extrakte hergestellt. Wiedergegeben sind Profile repräsentativer Proben von 12 Tage alten Keimlingen, Blüten, jungen Blättern, seneszenten Blättern, jungen Schoten und reifen Samen. Im Spektrum junger Schoten wurden die Quercetin- (Q) und Kaempferol-Derivate (K) der Flavonoide markiert. In den Profilen junger Blätter, seneszenten Blätter und reifer Samen wurden die Flächen der Peaks nach Integration bestimmt. Markiert sind hier die Flavonoide (1, 2 und 3 sowie unterschiedliche Flavonoide 1', 2' und 3' in der Samenprobe), die zur Quantifizierung der Reduktion von Flavonoiden in SL4cl3-Linien verwendet wurden. Der Stern markiert in diesen Profilen das prominenteste Sinapinsäure-Derivat (Sinapoyl-Malat) das zur Normierung der Quantifizierung verwendet wurde.

Mit Ausnahme der Samen ist deutlich in allen Geweben eine Reduktion an Flavonoiden zu erkennen. Wie erwartet unterschieden sich grundsätzlich die Gehalte und Muster an Flavonoiden in verschiedenen Geweben stark. In den Abbildungen der Profile seneszenten Blätter, Blüten, Schoten und Samen ist jeweils ein Profil von parallel durchgeführten tt4(2YY6)-Extrakten aufgeführt. Diese Proben verdeutlichten durch das vollständige Fehlen von Flavonoiden den starken biochemischen Phänotyp der *AtCHS*-Nullmutante.

Während in vegetativem Gewebe (Keimlinge, junge Blätter und senescente Blätter) drei Kaempferol-Derivate dominieren, sind Quercetin-Derivate kaum oder nur schwach (Keimlinge) nachzuweisen. In reproduktivem Organen wie Blüten, Schoten und den Samen waren Quercetin-Derivate Hauptbestandteile und die Muster wurden insgesamt komplexer. In allen Proben war ein Sinapinsäure-Derivat (Sinapoyl-Malat) nachweisbar. Es wurde angenommen, dass die Mutation in *At4CL3* den Gehalt an Sinapat-Derivaten nicht beeinflusst. Dieses konnte im Rahmen der Messgenauigkeit bestätigt werden, da bei gleichen Mengen eingesetzten Gewebes vergleichbare Mengen dieser Substanz nachgewiesen wurden. Andere, jedoch niedriger akkumulierende Sinapat-Derivate, verhielten sich vergleichbar (z.B. der Peak bei etwa 16 min im Profil der Samen; nicht gesondert markiert). Die relative Konzentration dieser Verbindung (*) ist über die Integration der Fläche zugänglich. Daher wurde dieser Peak in den untersuchten Spektren zur Normierung der Quantifizierung genutzt.

Zu dem oben beschriebenen Unterschied in den Mustern zeigte sich ein grundsätzlicher Trend im Gehalt von Flavonoiden verschiedener Gewebe im Vergleich der Wildtyp- und der *At4CL3*-Nullmutanten-Linie. Der Einfluss der Mutation war in jungem Gewebe am höchsten, dort waren drastische Reduktionen zu erkennen. Dies wurde ebenso für Blüten bestätigt, in denen die *At4CL3*-Wildtyp-Expression am höchsten ist. In älterem Gewebe war die beobachtete Reduktion weniger offensichtlich, speziell in Samen war kein reproduzierbarer Unterschied mehr zwischen der *At4CL3*-Nullmutante und den Wildtyp-Linien festzustellen.

Betrachtet man die Flavonoid-Verteilung, so sind in Samen, wie oben beschrieben, die höchsten Gehalte an Quercetin nachzuweisen, in Schoten sind ebenfalls mehrere prominente Quercetin-Derivate nachweisbar. Die Derivate der Quercetine und

Kaempferole, sowie die Sinapinsäure-Verbindung wurden über ihre charakteristischen UV-Spektren (Abbildung 39) identifiziert.

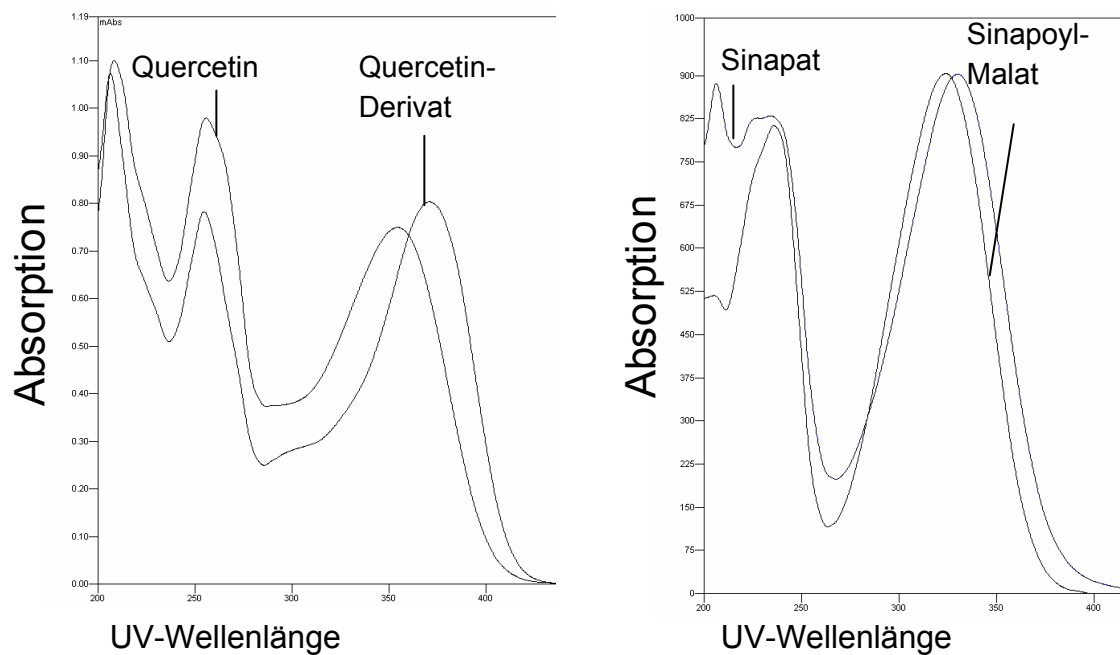


Abbildung 39: UV-Spektren der Standards von Quercetin und Sinapat, zusammen abgebildet mit den UV-Spektren von Verbindungen, die in den Extrakten nachgewiesen wurden.

Nicht dargestellt ist das dem Quercetin sehr ähnliche Spektrum von Kaempferol. Die Differenzierung zwischen Derivaten beider Verbindungen wurde über die spezifische Wellenlänge des zweiten Absorptions-Maximums erreicht. Aus technischen Gründen ist die Beschriftung klein dargestellt, abgebildet ist der Wellenlängenbereich von 200-400 nm.

Die folgende Abbildung 40 soll die relativen Reduktionen von Flavonoiden in ausgewählten Geweben verdeutlichen.

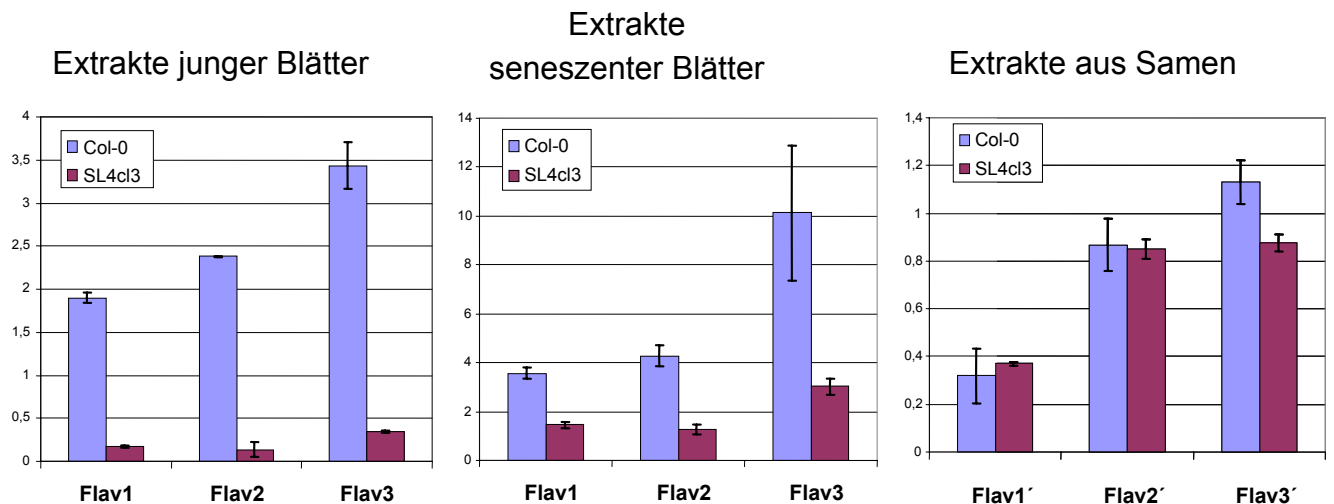


Abbildung 40: Quantifizierung der prominentesten Flavonoide in unterschiedlichen Geweben von At4CL3-Nullmutanten und Col-0 Wildtyp.

Die in den Profilen von Abbildung 38 markierten Flavonoide wurden über ihre Fläche quantifiziert und anhand der Fläche des Sinapoyl-Malats normiert. Die Verbindungen der Samen-Extrakte sind nicht identisch mit denen der Blätter, ein direkter Vergleich ist nicht möglich. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Werte in die Berechnung einbezogen, die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert wurde als Fehlerbalken angegeben. (Flav, Flavonoide 1-3, bzw. 1'-3')

Ein direkter Beweis für die Verknüpfung des charakterisierten Genotyps der At4CL3-Nullmutante mit dem hier beschriebenen biochemischen Phänotyp ist die Kosegregation der Mutation mit dem Phänotyp. Ein weiterer Beweis kann über die Charakterisierung unabhängiger Mutanten-Allele gewonnen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus der SALK- und der GARLIC-Population jeweils eine weitere At4CL3-Mutantenlinien isoliert. Zur Überprüfung der oben beschriebenen Ergebnisse wurden zwei weitere, unabhängige Mutanten-Linien (SA4cl3 und GA4cl3) ebenfalls auf Reduktion des Gehalts an Flavonoiden untersucht. Diese Analyse beschränkte sich auf die Untersuchung löslicher Sekundärmetabolite aus methanolischen Blattextrakten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Linie SA4cl3 eine zur Linie SL4cl3 ähnlich starke Reduktion an Flavonoiden im Vergleich zu der Linie Col-0 in den Extrakten löslicher Verbindungen aus Blattgewebe aufweist. Eine Verringerung des Gehalts an Flavonoiden konnte hingegen für die Linie der GARLIC-Population nicht bestätigt werden. Die Linien SA4cl3 und GA4cl3 tragen beide Insertionen der T-DNA in einem Intron (Abbildung 27, Kapitel 3.3.8, Seite 97). Das Fehlen des Phänotyps der Linie GA4cl3 könnte daher auf das korrekte Herausspleissen dieses Introns aus dem Primärtranskript zurückzuführen sein.

3.6.4 Das *At4CL4*-Gen: Untersuchung der Nullmutante *SL4cl4*

Die phylogenetischen und molekularbiologischen Analysen legten eine Funktion der *At4CL4* in der Klasse I der 4CLs nahe, assoziiert mit der Synthese von Vorstufen für die Ligninbiosynthese und der Synthese weiterer phenolischer Zellwandbestandteile. Aus diesem Grund wurden methanolische Extrakte löslicher Sekundärmetabolite mittels HPLC untersucht. Unterschiede in den Mustern der Sekundärmetabolite in Blättern von *At4cl4*-Nullmutanten- und Col-0-Wildtyp-Linien konnten jedoch nicht festgestellt werden.

Die beiden dominierenden löslichen Sekundärmetabolite in *A. thaliana* Wurzeln sind Coniferin und Syringin (pers. Mitteilung P. Bednarek), Substanzen die sich vom Grundgerüst der Sinapinsäure und der Ferulasäure, den bevorzugten Substraten der *At4CL4* ableiten.

Daher wurde der Einfluss der Nullmutation in der *At4CL4*-Mutante *SL4cl4* auf die Metaboliten-Verteilung in Wurzeln untersucht. Eingesetzt wurden hierfür steril angezogene Wurzelkulturen von *SL4cl4*- und Col-0-Linien.

Es konnte gezeigt werden, dass weder in der löslichen Fraktion der Sekundärmetabolite (exemplarisch mit in Abbildung 36 dargestellt), noch in den Extrakten hydrolysierter Zellwände (nicht dargestellt) reproduzierbare Unterschiede zwischen *SL4cl4* und Col-0 auftraten.

3.7 Biochemische Charakterisierung ausgewählter Mehrfachmutanten-Linien

Eine umfangreiche Untersuchung aller in dieser Arbeit hergestellten Mehrfachmutanten-Linien war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Daher wurde, wie im folgenden beschrieben, der Schwerpunkt der Analysen auf segregierende Populationen mehrerer heterozygoter Linien von *Zl4cl1/SL4cl2/fah1-2*-Nullmutanten gelegt, da die biochemische Analyse mögliche Hinweise zur Erklärung des beobachteten Phänotyps, dargestellt in Abbildung 35, geben kann.

Nach dem Modell des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (Abbildung 1, Kapitel 1.1.5, Seite 16) liegen die Enzyme der Gene *AtF5H*, *At4CL1* und *At4CL2* an Schlüsselpositionen, da der gesamte metabolische Fluss zu den Lignin-Vorstufen und allen weiteren Phenylpropanstoff-bezogenen C6-C3 Verbindungen, den 4-Cumarsäure-Derivaten, über diese drei Enzyme abläuft. Eine Untersuchung verschiedener Kombinationen der Nullmutanten dieser Schlüssel-Gene erlaubt die anhand von *in-vitro* Daten postulierten Positionen der Enzyme im Stoffwechsel *in vivo* nachzuweisen oder zu erweitern.

Mit Hilfe von HPLC wurden methanolische Extrakte löslicher Sekundärmetabolite in Nachkommen von zwei segregierenden Populationen heterozygoter *Zl4cl1/SL4cl2/fah1-2*-Nullmutanten untersucht. Hierdurch konnten sowohl homozygote *At4CL1/At4CL2*-Nullmutanten, als auch Mutantenlinien, in denen die homozygote Tripelmutation vorlag, analysiert werden. Als Kontrolle dienten jeweils Doppel-Mutanten, die das dritte Allel heterozygot trugen. Dies sollte sicherstellen, dass der Genom-Hintergrund aller Segreganten vergleichbar war. Zudem war bereits in früheren Analysen gezeigt worden, dass sich in biochemischen Analysen kein

Unterschied in den Metaboliten-Mustern zwischen heterozygoten Einzelmutanten und Col-0 Wildtyplinien nachweisen ließ.

In den Proben der *fah1-2*-Nullmutante konnten, wie erwartet, keine Sinapat-Derivate, wie das im Wildtyp als Hauptform vorliegende Sinapoyl-Malat, detektiert werden. Es konnte keinerlei Akkumulation von Edukten des mutierten *AtF5H*-Enzyms nachgewiesen werden. In den Extrakten der homozygoten Tripel-Mutante *ZI4cl1/SL4cl2/fah1-2* wurden drei zusätzliche Peaks identifiziert, die weder in Col-0 noch in den Kontrollen von Linien auftraten, die *ZI4cl1/SL4cl2*-heterozygot vorlagen. Durch Vergleiche mit UV-Spektren von Standards wurde die Vermutung nahegelegt, es handele sich um Derivate der 4-Cumarsäure und der Ferulasäure. Weitere Analysen zeigten, dass diese Peaks in WT-F5H Linien auf die homozygote Doppelmutation *ZI4cl1/SL4cl2* zurückzuführen war.

Die folgende

Abbildung 41 zeigt repräsentative HPLC-Profile ausgewählter Analysen.

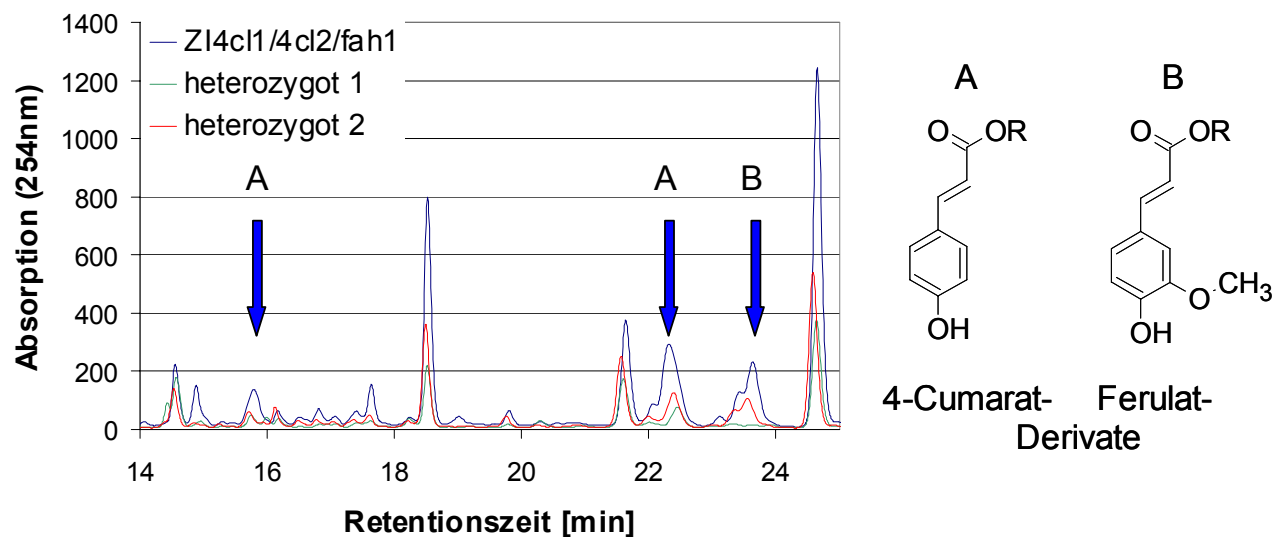


Abbildung 41: HPLC-Profile löslicher Sekundärmetabolite von Blattextrakten 6 Wochen alten *At4CL1/At4CL2/AtF5H*-Mehrfachmutanten.

Wiedergegeben wurden repräsentative Profile dreier Nullmutanten-Linien mit unterschiedlichen Kombinationen der Tripelmutationen. Blau dargestellt ist das Spektrum einer homozygoten Tripel-Mutante. Die Linie, deren Spektrum rot dargestellt ist, war homozygot für die Mutation des *At4CL1*- und des *AtF5H*-Gens, während das *At4CL2* heterozygot mutiert vorlag. Die grüne Linie repräsentiert eine Mutante, die für *At4CL1* heterozygot war, während beide anderen Gene homozygot mutiert waren.

Interessanterweise wurde die Menge an akkumulierenden 4-Cumarat- und Ferulat-Derivaten durch die funktionsfähige *AtF5H* nicht beeinflusst.

Der Ausgangspunkt aller hier aufgeführten Untersuchungen war das auf *in-vitro*-Daten basierende Modell des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (Abbildung 1, Kapitel 1.1.5, Seite 16) mit den anschließenden Synthesewegen zu Flavonoiden und zu Lignin-Vorstufen bzw. Zellwand-gebundenen phenolischen Komponenten. Die hier dargestellten Ergebnisse untermauern dieses Modell mit wertvollen *in-vivo* Daten. Die sich hieraus ergebenden Folgerungen, Erweiterungen und Konsequenzen werden in der folgenden Diskussion detailliert besprochen.

4 Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war eine Familie von Enzymen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Obwohl inzwischen mehr als 15.000 pflanzliche Sekundärstoffwechsel-Produkte isoliert und z.T. charakterisiert wurden, ist noch wenig darüber bekannt wie sich diese Vielfalt im Pflanzenreich entwickelte. Ebenso sind Informationen über die Funktionsweise der einzelnen Stoffwechselwege *in vivo* nur spärlich verfügbar. Hier stellt die genetische Modellpflanze *A. thaliana* ein wertvolles System dar. Die Komplexität der Sekundärstoffwechsel-Produkte ist in *A. thaliana* im Gegensatz zu den meisten anderen Pflanzen deutlich reduziert, nur etwa 50 Sekundärmetabolite wurden bislang beschrieben. Sie gehören 4 Klassen von Metaboliten an, den Glukosinolaten, weiteren indolischen Verbindungen, den Flavonoiden und den Zimtsäure-Derivaten. Die beiden letzten Verbindungs-Klassen werden in *A. thaliana* ausgehend von einem zentralen Stoffwechselweg, dem allgemeinen Phenylpropanstoffweg, gebildet. Von hier zweigen zwei Unterstoffwechselwege ab, der Syntheseweg der Flavonoide und der Weg zu Zimtsäure-Derivaten, den Vorstufen des Lignins und Zellwand-gebundenen phenolischen Substanzen.

Nach einem Modell, das auf *in vitro* Daten und indirekten Untersuchungen beruht, katalysiert eine Familie von Enzymen, 4-Cumarat:CoA Ligasen (*At4CLs*), den ersten Schritt, der in die beiden Unterstoffwechselwege führt, die Aktivierung von Zimtsäure-Derivaten (Abbildung 1, Kapitel 1.1.5, Seite 16).

Ziel dieser Arbeit war die Aufschlüsselung der Funktionen der einzelnen *At4CLs* und der Aufgabe ihrer Familie *in vivo*.

In den folgenden drei Abschnitten werden die Untersuchungen diskutiert, die die Basis bilden für eine Beschreibung der *in vivo*-Funktion der Familie und ihrer einzelnen Mitglieder:

In silico Untersuchungen der *At4CLs* im Kontext weiterer Paraloger sollten helfen, die Evolution dieser Familie im Pflanzenreich zu untersuchen. Detaillierte Vergleiche der *At4CLs* bildeten die Grundlage zur Interpretierung der Entstehung und weiteren Entwicklung der Multi-Genfamilie innerhalb der Spezies *A. thaliana*.

Die Enzymeigenschaften des wahrscheinlich letzten Mitgliedes, das die *At4CL*-Familie vervollständigt, wurden *in vitro* charakterisiert.

Nullmutanten der *At4CL*-Familie und weiterer Gene des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels wurden identifiziert, isoliert und analysiert, um das Modell dieses Stoffwechselwegs mit *in vivo* Daten zu untermauern und zu erweitern.

4.1 *In silico* Analysen

4.1.1 Die Familie der At4CLs

Zu Beginn der Arbeit umfasste die Familie der At4CLs drei Mitglieder, die sich in ihrem Expressionsmuster und den katalytischen Eigenschaften der heterolog exprimierten Enzyme unterschieden. Bei der Analyse der *in vivo*-Funktion von Multi-Genfamilien ist es von entscheidender Bedeutung, die Mitglieder im Zusammenhang aller Isoformen zu charakterisieren. Insbesondere partielle funktionelle Redundanzen innerhalb der Familie erschweren die Interpretation möglicher Phänotypen von Nullmutanten. Daher war es essentiell, sicherzustellen, dass mit den bearbeiteten Isoformen die Familie der At4CLs vollständig erfasst wurde.

Datenbankrecherchen ergaben eine Sequenz in *A. thaliana*, die auf der Ebene des abgeleiteten Proteins eine hohe Ähnlichkeit zu den bekannten At4CLs zeigte. Physikalisch lag diese Sequenz direkt benachbart zu At4CL2. Hierdurch wird die Vermutung gestützt, die Sequenz könne aus einer Tandem-Genduplikation hervorgegangen sein. Eine Ähnlichkeitsmatrix von 4CLs wurde durch paarweise Vergleiche von Isoformen unterschiedlichster Organismen gewonnen. Der ermittelte Schwellenwert grenzte dabei klar die als funktionelle 4CLs beschriebenen Proteine von 4CL-ähnlichen Sequenzen ab. Eingeschlossen wurde hierbei die neue *A. thaliana*-Sequenz, die daraufhin als At4CL4 bezeichnet wurde. Dieser Schwellenwert wird in Zukunft auch in anderen Spezies Vorhersagen zur Funktion weiterer putativer 4CLs, die auf Proteinsequenz-Vergleichen basieren, deutlich erleichtern sowie den heutigen rechnergestützten Vorhersagen und Annotierungen ein weiteres Kriterium hinzufügen.

4.1.2 Phylogenetische Analysen

Zur Präzisierung des Ergebnisses, das durch die paarweisen Vergleiche einzelner 4CLs gewonnenen wurde, wurden die Spezies-übergreifenden Vergleiche ausgedehnt auf phylogenetische Analysen aller 4CLs, die annotiert in Datenbanken verfügbar, bzw. bereits als *bona fide* 4CLs charakterisiert worden waren.

Die früher beschriebene Aufspaltung von 4CLs in zwei mutmaßlich funktionell unterschiedliche Klassen (Ehltling *et al.*, 1999) konnte bestätigt werden. Zusammen mit einem Vertreter aus Soja, Gm4CL1, gruppierte die neue At4CL4 am Rande der Klasse I-4CLs, deren postulierte Funktion die Synthese von Ligninvorläufern und der Synthese von phenolischen, Zellwand-assoziierten Verbindungen ist. Wenn die phylogenetische Verwandtschaft, wie in den Abbildungen 7 und 8 (Kapitel 3.1.5, Seite 64) dargestellt und zuvor bereits beschrieben (Cukovic *et al.*, 2001), mit einer funktionellen Verwandtschaft verknüpft ist, so ist die At4CL4 möglicherweise ebenfalls an der Synthese von Zellwandbestandteilen beteiligt. Ihre Ausnahmestellung zusammen mit der Gm4CL1 aus Soja könnte zusätzliche Hinweise auf ihre Funktion geben und wird weiter unten detailliert diskutiert.

Zudem konnte gezeigt werden, dass jeder der Äste des 4CL-Stammbaums, ausgehend von einem hypothetischen, berechneten Ursprung des ungewurzelterten

Baums, die Vertreter der mono- und dikotyledonen Pflanzen trug. Dies deutet auf eine evolutionär sehr frühe Trennung der Klasse I- und Klasse II-4CLs hin. Wird eine vergleichbare, lineare Mutationsrate der 4CLs angenommen, wie sie dem Modell der phylogenetischen Analysen zugrunde liegt, dann erfolgte die Entstehung beider Klassen, bevor die Evolution der Pflanzen an der Gabelung zu Mono- und Dikotyledonen angelangt war. Dies würde ebenfalls die höhere funktionelle Redundanz der Klasse I-Isoformen untereinander erklären, da sie entwicklungsbiologisch jüngeren Ursprungs sind und sich daher noch nicht so weit voneinander entfernt haben. Rezente Duplikationen innerhalb der heutigen Pflanzenlinien sind demnach sehr wahrscheinlich. Einige 4CLs, wie die der bislang untersuchten Isoformen in Petersilie, Kartoffel oder Tabak (Becker-André *et al.*, 1991; Douglas *et al.*, 1987; Lozoya *et al.*, 1988), spiegeln mit ihrer hohen funktionellen Ähnlichkeit eine niedrige Divergenz wider, wie sie für junge Duplikationen zu erwarten wäre. Vergleichende Untersuchungen auf Genom-Ebene, die über die lückenhaften Informationen einzelner Organismen hinausgehen, werden in Zukunft wesentlich leichter zugänglich sein, wie das Beispiel des fast vollständig sequenzierten Reisgenoms zeigt (Qiaoping *et al.*, 2001; Goff *et al.*, 2002). Anhand dieser Untersuchungen sollten die bereits gewonnenen Daten zu untermauern sein. Ein Ansatz hierfür wird im nächsten Kapitel beschrieben.

Sehr interessant in Hinsicht auf die Evolution der Klassen der 4CLs im Pflanzenreich sind alte Taxa, wie z.B. Farne und die Moose (aus der Abteilung der Bryophyten). Für das Moos *Physcomitrella patens* ssp. *patens* existiert eine EST-Datenbank. Ein Klon (dbEST Id: 9280158 EST name: gc62h02.y1 GenBank Acc:BI437572 GenBank gi:15262262) mit Homologie zu *At4CL1* cDNA konnte identifiziert werden. Leider aber war die dort abgelegte Sequenz von schlechter Qualität und deckte nicht die volle Länge der cDNA ab (<http://www.moss.leeds.ac.uk/startpage.html> PEP). Da Bryophyten Pflanzen ohne ein ligninbasierendes Gefäß-System sind, könnte die Existenz einer Sequenz mit Ähnlichkeit zu den Klasse I-4CLs, assoziiert mit der Ligninbiosynthese, Hinweise auf eine Funktion der 4CLs vor der Entwicklung moderner Landpflanzen geben.

4.1.3 Die Familie der Os4CLs

Die gewonnenen Kriterien und der Stammbaum wurden genutzt, um die Analyse auf weitere Pflanzenspezies zu übertragen. Hierfür bot die monokotyledone Pflanze Reis (*O. sativa*) eine ideale Gelegenheit.

Mit ungefähr 45.000 Genen besitzt Reis annähernd die doppelte Anzahl im Vergleich zu *A. thaliana*. Eine plausible Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass das Genom von Reis im Vergleich zu anderen Blütenpflanzen einer weiteren Runde an Duplikation unterworfen war (Bennetzen, 2002). Diese Tatsache spiegelt sich womöglich in kleinen Genfamilien wie der der 4CLs wider. Neben *A. thaliana* ist Reis die zweite Pflanze, deren verhältnismäßig kleines Genom annähernd vollständig entschlüsselt ist. Die beiden großen öffentlichen Sequenzprojekte "International Rice Genome Sequencing Project" (Kultivar: *Oryza sativa* ssp. *japonica* c.v. *Nipponbare*) und der "Chinese Academy of Sciences; Beijing, China" (Kultivar: *Oryza sativa* L.

ssp. *indica*) sowie etwa 10 kleinere Projekte stellen ihre Informationen über verschiedene Datenbanken, die miteinander abgeglichen werden, zur Verfügung. Diese Informationen wurden der Analyse zugrunde gelegt.

Die Übertragung bekannter Kriterien, die 4CL-spezifische Sequenzen charakterisieren, führte im Rahmen dieser Arbeit zur Identifizierung von drei weiteren 4CL-Sequenzen aus Reis, die nach Aufbereitung an GenBank übermittelt und als putative Os4LCs annotiert wurden. Mit den neuen, annotierten mutmaßlichen Mitgliedern Os4CL3-5 umfasst die 4CL Familie im Reis Kultivar japonica somit mindestens fünf Isoformen, Hinweise auf weitere zwei Mitglieder liegen bereits vor. Alle neuen Isoformen gruppieren innerhalb des phylogenetischen Baums der 4CLs zusammen in Klasse I. Sie sind daher möglicherweise mit der Synthese von Ligninen und weiteren zellwandgebundenen phenolischen Substanzen assoziiert. Dies könnte in Zukunft von besonderem Interesse sein, da sich die Ligninzusammensetzung monokotyledoner Pflanzen mit fast ausschließlich niedrig substituierten Monomer-Vorstufen (H-Lignin) deutlich von der komplexeren Zusammensetzung dikotyledoner Pflanzen (G- und S-Lignin) unterscheidet.

Mit den mindestens fünf Mitgliedern der Os4CL-Familie wird Reis aus der Familie der Monokotyledonen in Zukunft neben *A. thaliana* ein wertvolles Modell für die Rekonstruktion der Evolution von Genfamilien darstellen.

4.1.4 Genomanalyse von *A. thaliana*

Wie oben bereits diskutiert, umfasst die Klasse I der At4CLs drei Mitglieder, die evolutionär untereinander höhere Verwandtschaft zeigen als zu der Klasse II-Isoform. Diese Trennung in zwei Klassen konnte ebenfalls für weit voneinander entfernte Spezies des Pflanzenstammbaums gezeigt werden. Offenbar spalteten sich die beiden Klassen bereits sehr früh in der Entwicklung heutiger Landpflanzen von einem gemeinsamen Vorläufer ab. Ohno spekulierte, dass Gesamtgenom-Duplikationen eine Ursache für große Sprünge in der Entwicklung von Organismen im Laufe der Evolution darstellen (Ohno, 1970, 2R Hypothese). Eine der zwei Runden an Polyploidisierung (Genomduplikationen), wie sie für Blütenpflanzen beschrieben wurden (Bennetzen, 2002), könnte die Ursache für das Vorliegen der beiden Klassen sein.

Möglicherweise ergibt sich der klare Abstand der Mono- von den Dikotyledonen in den zwei Ästen aber auch aufgrund einer unterschiedlich differenzierten Funktion der Klassen in den Spezies. Über eine Trennung sogar vor der Evolution von Gymno- und Angiospermen wurde bereits spekuliert (Cukovic *et al.*, 2001).

Innerhalb einer Spezies lässt sich die Entstehung von Multi-Genfamilien über mehrere Mechanismen erklären. Einzelgen-Kopien können im Genom häufig in Form von Tandem-Anordnung nachgewiesen werden. Diese entstehen durch falsche Paarung bei der homologen Rekombination (*crossing-over*). Segment-Duplikationen kopieren hingegen gesamte Regionen eines Chromosoms. Die Balance der Gen-Expression struktureller Gene könnte somit erhalten bleiben, da physikalisch verknüpfte Regulator-Gene ebenso dupliziert wurden (*gene dosage*). Eine dritte Quelle der Duplikation exprimierter Gene besteht in der Retrotransposition (LINE,

long interspersed element retrotransposition). Da aber keine der hier untersuchten Duplikationen Intron-frei vorlag, was ein Hinweis auf diesen Mechanismus gewesen wäre, wurde dieser Aspekt nicht weiter betrachtet.

Das vollständig sequenzierte *A. thaliana*-Genom erlaubt globale Vergleiche gesamter Chromosomen gegeneinander. Umfangreiche Analysen wurden z.B. von der MIPS Arabidopsis Group (Munich Information Center for Protein Sequences) durchgeführt. Die Datensätze und die grundlegende Struktur der Segmentduplikationen bildeten die Basis der hier durchgeführten Genom-Analyse. Es konnte gezeigt werden, dass *At4CL1* auf Chromosom I und die auf Chromosom III in Tandemorientierung angeordneten *At4CL4/At4CL2* offenbar das Ergebnis der einzigen großen Segmentduplikation beider Chromosomen sind. Wie erwartet, wurden weder für das Segment, auf dem *At4CL3* liegt, noch für das *At4CL3*-Gen homologe Regionen gefunden, die auf eine Duplikation hingewiesen hätten. Das Gleiche gilt für weitere Duplikationen der Regionen der Klasse I *At4CLs*. Es liegen keine weiteren *At4CL*-ähnlichen Gene auf Regionen die mit den bekannten *At4CLs* verknüpft sind. Wenn es eine monophyletische Entstehung weiterer *At4CL*-ähnlicher Gene in *A. thaliana* aus möglichen funktionellen Vorläufern gegeben hat, so wird dies ebenso wie die Erzeugung der zwei Klassen an *At4CLs* evolutionär weit zurückliegen.

Somit erscheint die Entstehung der Klasse I *At4CLs* das Resultat einer Segment- und einer Tandemduplikation zu sein, während die Existenz des einzigen Klasse II Vertreters, *At4CL3*, möglicherweise auf eine wesentlich ältere Genomduplikation zurückzuführen ist. Ein Versuch zur Rekonstruktion der Evolution der *At4CL*-Familie wird weiter unten beschrieben.

4.1.5 Genstrukturanalyse der *At4CLs*

Anhand der bekannten bzw. für *At4CL4* abgeleiteten Sequenzen wurden die Grenzen der Intron-Exon-Bereiche bestimmt und die so erhaltenen Genstrukturen der *At4CLs* miteinander verglichen. Die mit zunehmender Komplexität der Gene dargestellte Reihe von *At4CL1*, *At4CL2* und *At4CL4* zeigt einen Sprung zu *At4CL3*. Eine schrittweise Evolution angenommen, legt diese Reihe nahe, dass *At4CL2* entwicklungsgeschichtlich mit *At4CL1* und *At4CL4* verknüpft ist, während *At4CL1* und *At4CL4* nicht direkt verbunden sind. Mit zwei weiteren Introns und damit insgesamt sieben Exons liegt *At4CL3* weiter entfernt von den Klasse I *At4CLs*. Das Gen erstreckt sich auch über den größten Bereich, es deckt eine um etwa 50% längere Region ab als z.B. *At4CL1*. Für den Übergang zwischen der Klasse I und der Klasse II wurde kein Bindeglied gefunden, somit zeigt hier erneut der Unterschied der Genstrukturen, dass es in *A. thaliana* zwei nicht-verknüpfte Klassen in dieser Familie gibt, die getrennt wurden, bevor sich die Spezies *A. thaliana* entwickelte.

Insgesamt ist sehr wenig bekannt über das Schicksal von Genen in Landpflanzen nach Genom-Duplikation (Zhao et. al., 1998), und über den Einfluss von Gen-Duplikationen in der Entwicklung der frühen Landpflanzen wurde kaum Literatur gefunden. Daher stellt die Gen-Familie der *At4CLs* ein wertvolles Beispiel zur Analyse der funktionellen Divergenz nach Duplikation dar.

Eine Aufteilung von Expressionsmustern duplizierter Gene, die ursprünglich in einer einzelnen Kopie vorlagen, wurde im Tierreich in einigen Fällen beschrieben (*engrailed*, *notch* und *Pax6*-Gene in Zebrafischen, Lynch und Force, 2000).

In einem klassischen, weit verbreiteten Modell erlauben duplizierte Gene mit zunächst vollständig redundanter Funktion die Mutierung und Änderung der Spezifität oder des Expressionsmusters einer der Kopien, während die grundsätzliche Funktionalität erhalten bleibt (Walsh 1995). Die neue Funktion kann zu einem evolutionären Vorteil des Organismus führen, sie wird somit durch den Selektionsdruck fixiert. Willkürliche Änderungen (Mutationen) der Aminosäuresequenz führen üblicherweise zu Nicht-Funktionalität eines Proteins, Mutationen mit Nutzen für den Organismus stellen die Ausnahmen dar. Interessanterweise aber findet man in heutigen Organismen 20-50% duplizierter Gene, die über mehrere Millionen Jahre erhalten blieben und sogar weiter dupliziert wurden (Lynch und Force, 2000). Aus diesem Grund wurde ein modernes Modell vorgeschlagen, in dem die Erhaltung der duplizierten Gene auf einem Mechanismus beruht, der durch komplementäre *loss-of-function* Mutationen erklärt wird (Averof und Akam, 1995). Dieses Modell erklärt das Schicksal eines, in vielen Geweben exprimierten Gens nach Duplikation durch spezifische Expression der Tochtergene in einzelnen, aber nicht-überlappenden Geweben.

Dies wird besonders augenscheinlich, wenn man die hohe Variabilität in Promotoren homologer Gene betrachtet. Eine veränderte Anordnung von *cis*-aktiven Elementen kann bereits zu vollständig veränderter Expression führen. Solange Expression in den ursprünglichen Geweben für die Spezies lebensnotwendig war, muss die Summe der Expressionen der Duplikate gleich bleiben und wird durch natürliche Selektion erhalten. Resultat ist die Fixierung beider Tochtergene (Bhattacharya *et al.*, 2000).

4.1.6 Promotoranalyse der *At4CLs*

Daher war es interessant, die Promotorstruktur der bekannten *At4CLs* und weiterer Phenylpropanstoff-Genen mit der der neuen *At4CL4* zu vergleichen, um Vorhersagen bezüglich gewebespezifischer Expression treffen zu können. Bislang wurden für Promotoren von Phenylpropanstoff-Genen mehrere mutmaßlich *cis*-aktive Elemente beschrieben (Logemann *et al.*, 1995).

Die koordinierte Regulation der Expression von Phenylpropanstoff-Genen in Antwort auf spezifische Stimuli wie Pathogene wurde bereits früher gezeigt. Speziell für die Familie der *At4CLs*, die eine Schlüsselposition im allgemeinen Phenylpropan-Stoffwechselweg einnehmen, ist strikte Gewebe- und Stimuli-spezifische Expression von großer Bedeutung.

Es war im weiteren Kontext der Arbeit von Interesse, neben Sequenzvergleichen auf Protein-Ebene ein Kriterium zu entwickeln, anhand dessen mutmaßliche Phenylpropanstoff-Gene beurteilt werden können. Gene des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels enthalten Elemente, die als P und L-Boxen bezeichnet werden (Lois *et al.*, 1989; da Costa e Silva *et al.*, 1993; Logemann *et al.*, 1995).

Darüber hinaus wurde ein weiteres mutmaßliches Element, Box A, über *in vivo* DNA-*footprints* identifiziert.

Der bislang auf der Basis dieser "*footprints*" beschriebene Konsensus für die Boxen P, A, und L hat den Nachteil, dass die für die Funktion notwendigen und hinreichenden Nukleinsäuren innerhalb der Bereiche der Boxen nicht klar definiert sind. Aus diesem Grund wurde die Häufigkeitsverteilung der Nukleotide an jeder Position der Boxen mit mehr als 20 verschiedenen, bereits beschriebenen Elementen bestimmt.

Die folgende Diskussion basiert auf einem noch nicht abgeschlossenen Gemeinschaftsprojekt. In Zusammenarbeit mit K. Berentzen und D. Wanke (MPI für Züchtungsforschung) wurde eine Methode entwickelt, mit der gesamte Genome durchsichtet werden können, um das Auftreten bestimmter Elemente in den Promotoren statistisch zu untersuchen. Diese Untersuchung wurde für den *At4CL4*-Promotor eingesetzt. Auf Details zur Analyse des *A. thaliana*- und *O. sativa*-Genoms wird daher nur knapp eingegangen.

Die oben beschriebene Verteilung wurde als Häufigkeits-Matrix bezeichnet und diente einer präziseren Beschreibung des Konsensus. Mit Hilfe eines Algorithmus (K. Berentzen, unveröffentlicht als "Motiv-Mapper") wurden mutmaßliche P-, A- und L-Boxen im Promotor von *At4CL4* gefunden. Die Elemente zeigten jedoch ein abweichendes Muster von der in den *At4CLs* bislang beschriebenen Verteilung. Für das als Box A beschriebene Element wurden mehrere mutmaßliche Regionen im Promotor von *At4CL4* identifiziert. Dies ist auf die relativ weiche Anwendung des Konsensus zurückzuführen, der alleine für sich als Kriterium nicht gültig sein kann, da die Ergebnisse mit zwei erlaubten Austauschungen in einer 6 bp-Region nur wenig Information bieten.

Grundsätzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass die hier entwickelte Matrix ein wertvolles Werkzeug zur Analyse einzelner Promotoren darstellt. Die Anwendung zur Durchsichtung großer Datenmengen wird im Folgenden kurz diskutiert. Alle Promotoren des *A. thaliana* Genoms wurden extrahiert (1.500 bp stromaufwärts des ATG-Startkodons, unveröffentlicht, K. Berentzen) und mit der Matrix durchsucht. Als Kontrollgruppe wurde eine Sammlung von Promotoren aus 35 Phenylpropanstoff-Genen verschiedenster Organismen eingesetzt. Diese Kontrollgruppe wurde bei der durchgeführten Analyse erfasst und lag in dem resultierenden Datensatz mit den P, A und L-enthaltenden Promotoren von Genen aus *A. thaliana* vollständig vor, was bedeutet, dass jedes der Kontroll-Gene diese drei Elemente mutmaßlich trägt. Dies erweitert bereits bekannte Ergebnisse, nach denen ein Satz von drei charakteristischen Sequenz-Motiven (die Boxen P, A und L) in allen bis dahin bekannten PAL- und 4CL-Promotoren (mit drei Ausnahmen, in denen nur limitierte Promotor-Sequenz zur Verfügung stand) vorhanden waren (Logemann *et al.*, 1995). Aufgrund der Tatsache, dass der vollständige Satz von Elementen noch in keinem Gen außerhalb des Phenylpropanstoffwechsels gefunden wurde, wurde in dieser Publikation spekuliert, dass der funktionelle Grund hierfür in der koordinierten Regulation liegen könnte.

Interessanterweise wurden in diesem vorläufigen Datensatz neben den bereits bekannten Genen verstärkt Gene mit Transporter- oder Transporter-ähnlicher annotierter Funktion gefunden. Das könnte die Spekulation zu möglichen

funktionellen Querverknüpfungen der nicht direkt mit dem Phenylpropanstoffwechsel assoziierten Gene mit den Phenylpropanstoff-Genen stützen. Leider sind die erhaltenen Schnittmengen mit mehr als 1000 Mitgliedern noch zu groß für genauere Analysen der einzelnen Gene, daher müssen zunächst weitere Kriterien zur präziseren Vorhersage der Elemente eingeführt werden.

Dennoch dürfte das Auftreten der Elemente P, A und L in verschiedenen Gruppen von Genen auf eine ähnliche transkriptionelle Regulation hindeuten, was in Zukunft durch Expressionsanalysen auf der Ebene des gesamten Transkriptoms überprüft werden könnte.

Der Promotor von *At4CL4* wurde mit Hilfe der PLACE-Datenbank auf das Auftreten weiterer möglicher Elemente untersucht. Es wurden mehrere putative W-Boxen identifiziert. W-Boxen sind *cis*-aktive Elemente mit dem DNA-Sequenzmotiv (T)(T)GAC(/T), das die spezifische Bindungsstelle für WRKY-Proteine darstellt (Eulgem *et al.*, 2000). Die von den pflanzenspezifischen WRKY-Transkriptionsfaktoren über die W-Boxen vermittelten Expressionsmuster sind zahlreich, obwohl die Regulation der Genexpression häufig im Zusammenhang mit Pathogen-Responsivität, Verwundung oder Seneszenz steht. Für einige der WRKY-Faktoren wurde dies bereits klar gezeigt (z.B. Induktion von WRKY-6 im Zusammenhang mit pathogenen Bakterien und WRKY-11 in seneszenten Blättern, Robatzek *et al.*, 2001). Keines der bislang bekannten Phenylpropanstoff-Gene besitzt W-Boxen innerhalb eines Bereichs 800 bp stromaufwärts des ATG-Startkodons. Damit stellt *At4CL4* eine Ausnahme innerhalb dieser Gene in *A. thaliana* dar. Weiter wurde gezeigt, dass die W-Box in Promotoren von charakterisierten Phenylpropanstoff-Genen statistisch gesehen stark unterrepräsentiert ist. Interessant ist das Auftreten von W-Boxen im *At4CL4*-Promotor besonders im Zusammenhang mit den bereits bekannten Expressionsdaten der *At4CL1* und *At4CL2*, für die eine Pathogen-Responsivität bereits gezeigt wurde (Ehltling *et al.*, 1999), obwohl sie keine W-Boxen im dem Promotor-Bereich tragen, der als relevant angesehen wird. Zumindest in *At4CL1* und *At4CL2* wird die Pathogen-responsive Expression somit ohne W-Boxen und damit höchstwahrscheinlich auch ohne WRKY-Transkriptions-Faktoren reguliert. Die Identifizierung mutmaßlicher W-Boxen im Promotor von *At4CL4* wurde untermauert durch eine *in vitro* WRKY-Bindestudie, in der zwei der drei untersuchten W-Boxen eine Bindung zu einem heterolog exprimierten WRKY-Proteinfragment mit der W-Box Bindedomäne von WRKY-11 zeigten. Diese Untersuchung wurde von I. Ciolkowski durchgeführt und ist Bestandteil seiner Dissertation. Daher wird an dieser Stelle nicht weiter auf Details eingegangen.

Die putative WRKY-abhängige *in vivo* Pathogen-Responsivität der *At4CL4* wurde später über die Analyse von *At4CL4*-Expression in *A. thaliana* Zellkultur untersucht, die mit einem pilzlichen Elicitor behandelt wurde. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.2.5 diskutiert.

Um weitere Informationen über mutmaßliche Verwandtschaften zu erhalten, die für *At4CL4* helfen sollen, eine differenzielle Funktion vorzuschlagen, wurde versucht, die bereits bekannten Daten zu einem Modell zu kombinieren. Dieses Modell beschreibt die entwicklungsbiologische Entstehung der *At4CLs*.

4.1.7 Rekonstruktion der Evolution der At4CLs

Heutige Genfamilien sind zumeist das Resultat verschiedener Duplikations-Ereignisse, deren Produkte im Laufe der Entwicklungsgeschichte kontinuierlichen Mutationen unterworfen wurden. Nach dem oben beschriebenen Modell stellen duplizierte Gene einen wertvollen Material-Pool der Evolution dar. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwieweit sich mit den bislang gewonnenen Informationen die Evolution der At4CLs beschreiben lässt. Im Folgenden wird ein Modell diskutiert, das die Entstehung der heutigen 4CLs der Klassen I und II in *A. thaliana* erklären soll.

Die Existenz von zwei 4CL-Klassen, die weiter als bis in die frühe Auftrennung des Pflanzenreiches in Mono- und Dikotyledonen reicht, deutet auf eine sehr alte Duplikation hin, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Polyploidisierung zurückzuführen ist. In *A. thaliana* wurden keine weiteren Vertreter der Klasse II entdeckt, sodass in der folgenden Betrachtung die weitere Entwicklung der Klasse I im Vordergrund steht.

Aufgrund der Genomstruktur der drei Klasse I-At4CL-Gene und der benachbarten Anordnung der At4CL2 und At4CL4 kann auf eine Segment- und eine Tandemduplikation, ausgehend von einem Vorläufer-Gen, geschlossen werden. Hierbei ist nicht direkt ersichtlich, in welcher Reihenfolge und durch welchen Mechanismus die jeweiligen Isoformen entstanden. Durch Ausschlusskriterien lassen sich anhand der bekannten Informationen weitere Schlüsse ziehen.

At4CL1 und At4CL2 liegen auf getrennten Chromosomen, daher erscheint es offensichtlich, dass sie das Resultat einer Segmentduplikation darstellen. Dennoch besteht im Prinzip die Möglichkeit, dass beide Gene ein gemeinsames Vorläufer-Gen besitzen, das nach Tandemduplikation Vorstufen von At4CL1 und At4CL2 hervorbringt. Diese Konstellation ergäbe nach der Segmentduplikation At4CL1- und At4CL2-Vorläufer-Paare auf jedem Segment der Chromosomen I und III. Im Laufe der weiteren Entwicklung erforderte dies, dass eine Variante jedes Gens fixiert, während das Duplikat im Fall von At4CL1 eliminiert wird. Das At4CL2-Duplikat böte jedoch Spielraum für die Entwicklung der At4CL4. Resultat wäre die heute beobachtete Konfiguration. Diesem Szenario widersprechen jedoch mehrere Gründe. Bei einer Nahbetrachtung der Region, die der Segmentduplikation unterworfen war, fiel auf, dass jeder der zwei Bereiche in konservierter Reihenfolge mehrere homologe Gene enthielt und dass die Ähnlichkeit der homologen Gene auf Proteinebene in allen Fällen über 80% erreichte (Abbildung 10, Kapitel 3.1.6, Seite 69). Da dies auch für At4CL2 und At4CL1 gilt, besitzen sie höchstwahrscheinlich evolutionär den gleichen Abstand wie ihre durch Segmentduplikation erzeugten Nachbarn. Das bedeutet, dass At4CL1 und At4CL2 ebenfalls durch Segmentduplikation entstanden sein müssen. Daher erscheint es plausibel, dass das auf Proteinebene entferntere At4CL4, ohne Partner auf Chromosom I, das Resultat einer Tandemduplikation von einem gemeinsamen Vorläufer mit At4CL2 repräsentiert. Die Reihenfolge der Ereignisse ist aber noch ungeklärt.

Geht man von einer frühen Segmentduplikation aus, der eine Tandemduplikation nachfolgt, die zur Bildung der At4CL2 und At4CL4 führte, dann könnte dies prinzipiell das Fehlen eines At4CL4-ähnlichen Gens auf Chromosom I erklären. Gegen dieses

Szenario spricht aber klar die evolutionäre Distanz von *At4CL4* zu *At4CL1* und *At4CL2*. Sie erreicht auf Proteinebene die Distanz der *At4CL3*, entspricht daher auch wahrscheinlich einer frühen Abspaltung.

Das folgende Modell ist somit die plausibelste Erklärung aller vorhandenen Daten:

Ein *At4CL2/At4CL4*-Vorläufer wird früh in der Entwicklung in Tandemorientierung dupliziert. Beide Gene entfernen sich strukturell und funktionell im Laufe der Evolution kontinuierlich voneinander, bis die Tandem-Gene einer weiteren Segmentduplikation unterworfen werden. Einer der *At4CL2*-Vorläufer wird neben *At4CL4* als das heutige *At4CL2* fixiert, die andere Kopie entfernt sich wie die Umgebung von ihren Kopien und wird zu der heutigen *At4CL1*. Resultat ist der gleiche Sequenzabstand zu *At4CL2* wie die Umgebung zu den erhaltenen Kopien (Abbildung 10). Das Duplikat der *At4CL4* geht dabei im Laufe der Zeit verloren. Weitere Tatsachen untermauern dieses Modell:

Direkt neben *At4CL1* existiert ein DNA-Segment, das den gleichen Sequenz-Abstand zum flankierenden nächsten Homologen der MAP-Kinase 4 zeigt, wie er auch zwischen *At4CL2* und der homologen MAP-Kinase 5 vorliegt. Hier befindet sich die Position der *At4CL4*.

Die zunehmende Komplexität der Gen-Struktur verknüpft *At4CL1* mit *At4CL2*, das wiederum mit *At4CL4* verbunden ist.

Ein gemeinsamer *At4CL2*-Vorläufer erscheint als wahrscheinlich, da sie von allen Klasse I-Isoformen die höchste Ähnlichkeit zu der *At4CL3* der Klasse II zeigt.

Es kommt hinzu, dass *At4CL1* und *At4CL3* auf einem Chromosom liegen, was durch eine Genomduplikation nicht erklärbar ist.

Folgende Abbildung 42 stellt das hier entwickelte Modell zur Evolution der *At4CLs* dar:

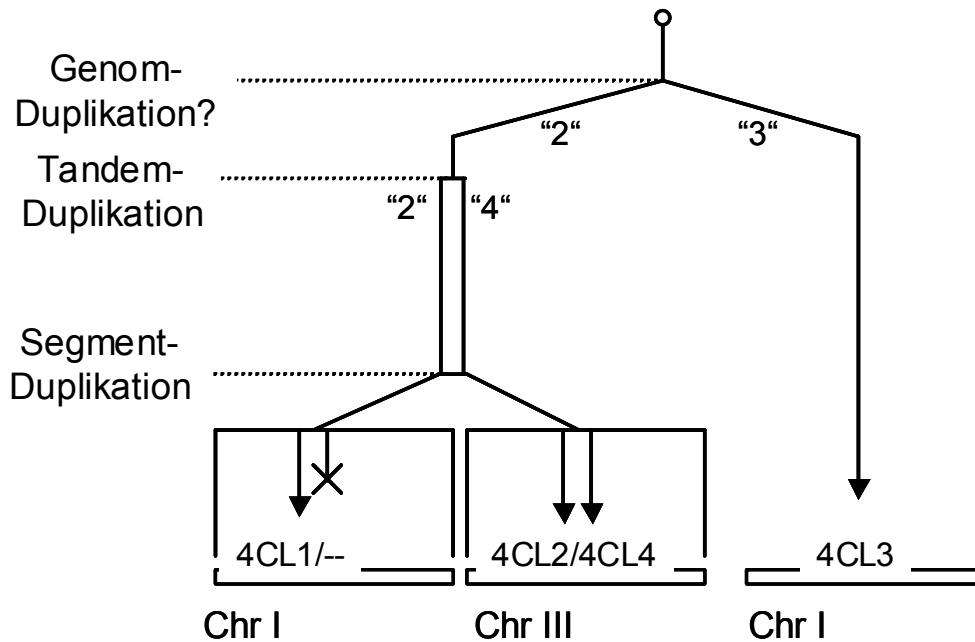


Abbildung 42: Modell zur Entstehung und Evolution der *At4CLs* nach mehreren Duplikationsrunden. (Weitere Beschriftung befindet sich auf der folgenden Seite)

Dargestellt ist die Entwicklung der *At4CLs*, die in dem Schema aus Platzgründen als 4CL1-4 bezeichnet wurden. Ausgehend von der Spitze wurden durch Genomduplikation, markiert durch die obere gestrichelte Linie, Repräsentanten der beiden Klassen I und II erzeugt. Die Entwicklung der Pflanzen, die auch *A. thaliana* hervorbrachte, fand zeitlich anschließend statt, daher die Angabe der mutmaßlichen *A. thaliana*-Vorläufer in Anführungszeichen. Eine Tandemduplikation (zweite gestrichelte Linie) führt in *A. thaliana* zu der frühen Abspaltung der *At4CL4* von der *At4CL2*. Eine Segmentduplikation erzeugt später eine Kopie von *At4CL2* und *At4CL4* auf einem weiteren Chromosom (I). *At4CL4* wird neben der weiter evolvierenden *At4CL2* fixiert, während die Kopie neben der jungen, parallel zur *At4CL2* entstehenden *At4CL1* verloren geht. Im gleichen Zeitraum entwickelte sich der einzige Klasse II-Vertreter der 4CL-Isoformen in *A. thaliana* zu *At4CL3* auf Chromosom I.

Die genomisch weit aufgeklärte Konstellation der *At4CL*-Genfamilie, die höchstwahrscheinlich auf verschiedene Mechanismen von Duplikationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zurückzuführen ist, stellt somit ein wertvolles Werkzeug zur Beschreibung der Evolution kleiner Gen-Familien dar.

Eine besondere Funktion der *At4CL4* wäre somit jedoch nicht nur durch die phylogenetische Randstellung zusammen mit der *Gm4CL1* aus Soja in der Klasse I zu erklären. Aufgrund des postulierten Verlusts des nahen Verwandten und ursprünglichen Tandem-Partners, der *At4CL4*-Kopie neben *At4CL1*, könnte mit *At4CL4* eine Variante existieren, die nur geringe funktionelle Überlappung mit *At4CL1/At4CL2* zeigt. Daher bestand der nächste Schritt der Analyse in der *in vitro* Charakterisierung der heterolog exprimierten *At4CL4*. Mögliche Unterschiede der kinetischen Enzymeigenschaften können helfen, das Puzzle der *At4CL4*-Funktion weiter zu vervollständigen.

4.2 *In vitro* Analysen

4.2.1 Erste Serie: Heterologe Expression von *At4CL4* mit dem pQE-70 System

In einem ersten Ansatz wurde das pQE-70 System eingesetzt, um *At4CL4* heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Im Anschluss an die im Kapitel 2.8.1 (Seite 50) beschriebene Subklonierung und den Transfer in den Expressionsvektor zeigten sich allerdings erste Probleme. Durchweg niedrige Wachstumsraten deuteten auf eine mögliche Unverträglichkeit der rekombinanten *E. coli*-Klone gegenüber niedriger Hintergrundexpression des Proteins hin. Ferner wurde eine überraschend hohe Rate an Mutationen in den sequenzierten Proben der Klone gefunden. Keiner von 18 mutmaßlich positiven untersuchten Expressions-Klonen war in der Lage, mittels SDS-PAGE und Coomassie-gefärbtem Gel nachweisbare Mengen an heterologem Protein zu exprimieren. Dennoch war eine schwache Enzymaktivität in drei unabhängigen Proben im Multititerplatten-Test detektierbar.

Es wurde ein deutlicher Unterschied in der Umsatz-Geschwindigkeit und der Substratpräferenz gegenüber einer parallel exprimierten Kontrolle mit funktioneller 4CL erkennbar. Zum ersten Mal war mit einer klonierten und heterolog exprimierten 4CL Aktivität gegenüber Sinapinsäure nachzuweisen. Die dennoch niedrigen Umsatzraten und die Totalausfälle von 15 Klonen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Mutationen, kurze Insertionen bzw. Deletionen zurückzuführen, die in den Sequenzen der Klone im Anschluss nachgewiesen wurden. Western-Analyse zeigte sowohl Hintergrund-Aktivität in den uninduzierten Kontrollen, ein hohes Maß an Degradation innerhalb der Proben nach Induktion als auch eine durchweg niedrigere Expression der drei aktiven Enzyme. Dies deutete ebenfalls auf möglich toxische Effekte der heterolog exprimierten *At4CL4* in *E. coli* hin. Der Grund hierfür könnte in der veränderten Substratspezifität im Vergleich zu den bislang erfolgreich exprimierten *At4CLs* liegen. Sinapinsäure ist das unpolarste und sterisch anspruchsvollste der bislang eingesetzten physiologischen Substrate der *At4CLs*. *At4CL4* könnte somit durch die bevorzugte Umsetzung von Sinapinsäure ebenfalls eine höhere Affinität zu unpolaren bakteriellen Fettsäure-Derivaten oder weiteren bakterienspezifischen Metaboliten aufweisen. Derart unphysiologische Eingriffe in den Bakterien-Stoffwechsel könnten die Beobachtungen erklären.

Zur Lösung dieses Problems bot sich alternativ das heterologe *E.coli* Expressionssystem pET-30 an. Durch ein effizienteres Repressionssystem sollte hierbei Hintergrund-Expression und die dadurch offensichtlich verursachten Komplikationen ausgeschlossen werden.

4.2.2 Zweite Serie: Heterologe Expression von At4CL4 mit dem pET-30 System

Nach Klonierung in den pET-30 Expressions-Vektor wurden mehrere mutmaßlich At4CL4-tragende Expressions-Konstrukte sequenziert. Obwohl in dieser Arbeit nur zwei unterschiedliche Systeme getestet wurden, fiel auf, dass alle sequenzierten Expressions-Konstrukte dieses Ansatzes auf Anhieb fehlerfrei waren. Zwei unabhängige Klone wurden ausgewählt, deren heterologe Protein-Expression nach Induktion mittels silbergefärbtem Gel leicht nachweisbar war. Mit Hilfe eines heterologen gegen die Petersilie Pc4CL hergestellten Antikörpers wurde in gereinigten Enzym-Fractionen dieser beiden Proben spezifische Expression von At4CL4 nachgewiesen. Über Nickel-Affinitäts-Chromatographie gereinigte Enzym-Fractionen dieser Klone wurden in allen weiteren Untersuchungen der Enzymkinetik eingesetzt.

4.2.3 Enzymkinetik von heterolog exprimierter At4CL4

Durch die Umsetzung von 4-Cumarat durch die heterolog exprimierte At4CL4 war der Nachweis erbracht, dass per Definition eine vierte *bona fide* 4CL in *A. thaliana* existiert. Allerdings legte ein hoher Km-Wert nahe, dass 4-Cumarat *in vivo* vermutlich nicht das bevorzugte Substrat darstellt. Ebenso wie die anderen Isoformen in *A. thaliana* zeigte auch At4CL4 ein charakteristisches Muster der Substratspezifität. Im Gegensatz zu den bekannten At4CLs zeigte At4CL4 die ansteigende Affinität zu den höher substituierten Zimtsäurederivaten Ferulat und Sinapat. Eine Sinapat-Umsetzung konnte bislang mit *A. thaliana* Protein-Rohextrakten des Sprosses nicht nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 1997; Büttner, 1998). Dies kann entweder auf ein niedriges Expressionsniveau, besondere Gewebespezifität oder auf eine unterschiedliche Substratspezifität der At4CL4 *in vivo* hindeuten. Ein möglicher Grund für eine veränderte Spezifität *in vivo* könnten Multi-Enzymkomplexe sein, in denen die Intermediate kanalisiert werden. Solche Komplexe wurden bereits früh für den Phenylpropanstoffwechselweg vorgeschlagen (Stafford, 1974), und es fanden sich in der nachfolgenden Zeit vermehrt Hinweise, die diese Hypothese stützten. Verankert durch Membranproteine wie die C4H, C3H (Kaffeat-3-Hydroxylase) oder F3'H (Flavonoid-3'-Hydroxylase) könnten die Enzyme der Komplexe schwach miteinander assoziiert sein und eine lineare Umsetzung der Substrate durch Weiterreichen der Intermediate begünstigen (Hrazdina, 1992; Burbulis und Winkel-Shirley, 1999). Unterschiede können ebenfalls durch Kompetitoren hervorgerufen werden, die im Gewebe vorliegen, während die Substrattests *in vitro* jeweils nur mit einem einzigen Edukt durchgeführt wurden. Beschrieben wurde dieser Effekt für die Espen 4CL1, deren Aktivität gegenüber Ferulat und 4-Cumarat durch Zimtsäure in Substratgemischen stark kompetitiv gehemmt wurde (Harding *et al.*, 2002). Letztlich zeigen diese Beispiele, dass *in vivo* umgesetzte Substrate nicht die sein müssen, die *in vitro* mit der höchsten Affinität der Enzyme umgesetzt wurden.

In Tabak konnte gezeigt werden, dass eine "sense"-Supprimierung von 4CL-Aktivität zu Reduktion von Guaiacyl- und Syringyl-Resten im Lignin führte, eine 4CL ist somit offenbar in Tabak an der Synthese von Syringyl-Einheiten beteiligt (Kajita *et al.*, 1996; Kajita *et al.*, 1997). *At4CL1* aktiviert bevorzugt 4-Cumarat (Hydroxy-Guaiacyl/Guaiacyl-Vorläufer) und *At4CL2* zeigt 10-fach höhere Affinität gegenüber Kaffeeat (Guaiacyl-Vorläufer) als gegenüber anderen Zimtssäure-Derivaten. Eine denkbare Position der *At4CL4* innerhalb der Klasse I-Phenylpropanstoffwechsels würde die Aktivierung von Ferula- oder 5-Hydroxyferulasäure darstellen. Trotz der niedrigen Expression wäre eine Funktion im Rahmen der Synthese von hochsubstituierten S-Lignin-Vorstufen plausibel.

4.2.4 Sinapat-Aktivierung, eine seltene Kuriosität?

Zu Beginn der Arbeit waren nur sieben Pflanzen bekannt, in denen, katalysiert von Proteinextrakten, eine Sinapat-Aktivierung nachgewiesen werden konnte (Knobloch und Hahlbrock, 1975 (Soja), Ranjeva *et al.*, 1976 (Petunie), Wallis und Rhodes, 1977 (Bohne), Kutsuki *et al.*, 1981, Grand *et al.*, 1983 (Pappel)).

Parallel zu den hier dargestellten *in vitro*-Untersuchungen zur *At4CL4*-Funktion wurde erstmalig die Klonierung und heterologe Expression einer Sinapat-umsetzenden 4CL, *Gm4CL1* aus Soja, publiziert (Lindermayr *et al.*, 2002). Das Auftreten dieser Isoform war bereits 1975 beschrieben worden (Knobloch und Hahlbrock, 1975) ebenso wie Messungen zur Enzymaktivität, in denen Sinapinsäure-Aktivierung nachgewiesen wurde.

Im Vergleich mit den bereits charakterisierten Isoformen zahlreicher Organismen stellen die beiden bisher beschriebenen Sinapat-umsetzenden Isoformen, *Gm4CL1* und *At4CL4*, seltene Ausnahmen dar. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde das Reisgenom, das ebenfalls zu einem großen Teil sequenziert ist, auf Isoformen durchsucht, die eine ähnliche Substratspezifität zeigen könnten. Zusätzlich zu den zwei bekannten *Os4CL* Isoformen wurden weitere drei putative Isoformen identifiziert. Keine der *Os4CL* Isoformen zeigte jedoch auffällige Ähnlichkeit zu *At4CL4* oder zu *Gm4CL1*. Ein weiterer Aspekt der *O. sativa*-Isoformen wird im nächsten Abschnitt betrachtet.

Die gemeinsame Gruppierung der *Gm4CL1* und *At4CL4* innerhalb des phylogenetischen Baums basiert auf Verwandtschaft der Proteinsequenz. Wenn Änderungen der Aminosäuresequenz die Substratspezifität bedingen, dann ließe sich möglicherweise eine strukturelle Eigenheit der Sinapat-umsetzenden Isoformen in der konservierten Sequenz identifizieren. Daher wurden beide Sequenzen mit dem Konsensus aller bekannter 4CLs verglichen. Es stellte sich heraus, dass es nur eine einzige Position gibt, in der sich *Gm4CL1* und *At4CL4* von allen anderen Isoformen unterscheiden. Dabei handelt es sich nicht, wie erwartet, um einen Aminosäure-Austausch, der die postulierte Substrat-Bindestasche (Stuible *et al.*, 2000) für das gegenüber 4-Cumarat und Ferulat voluminösere Sinapat erweitert, sondern um eine Deletion eines einzigen Leucin- (*At4CL4*) bzw. Valin-Restes (*Gm4CL1*). K. Schneider (MPI für Züchtungsforschung, unveröffentlichte Ergebnisse) konnte zeigen, dass die

Deletion dieser Position aus der Sequenz von *At4CL2* zu einer messbaren Affinität des heterolog exprimierten Enzyms gegenüber Sinapinsäure führte.

Keine der Reis-Sequenzen trug die Deletion in dem untersuchten Bereich. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass eine Isoform mit der Fähigkeit der Sinapinsäure-Aktivierung in Reis existiert. Diese Tatsache deckt sich mit der Lignin-Zusammensetzung von Reis, da hoch-methoxyliertes Syringyl-Lignin, wie es in Dikotyledonen gefunden wird, in monokotyledonen Pflanzen nicht vorkommt.

Innerhalb der Familie pflanzlicher 4CLs ist es unwahrscheinlich, dass die beiden einzigen klonierten, Sinapat-umsetzenden Isoformen zufällig an dieser Position vom allgemeinen Konsensus abweichen. Da in der Diskussion der phylogenetischen Analysen gezeigt wurde, dass *At4CL4* in *A. thaliana* durch eine Tandemduplikation entstand, hat die Evolution offenbar diese zwei Isoformen mit der ungewöhnlichen Substratspezifität unabhängig voneinander hervorgebracht. Ob dies auch für evtl. weitere, bislang nicht nach gewiesene 4CLs mit Sinapat-Aktivität gilt, muss noch gezeigt werden. Ein Mechanismus der unabhängigen Evolution von Enzymen wurde bereits diskutiert für Stilben-Synthasen. Hier ergab sich aufgrund der phylogenetischen Gruppierung von vier Stilben-Synthasen mit 34 bekannten Chalcon-Synthasen ein Modell, das die getrennte Evolution von Stilben-Synthasen in mehreren Organismen wahrscheinlich macht (Tropf *et al.*, 1994).

Sinapinsäure-umsetzende Isoformen von 4CLs könnten somit besondere Mitglieder der 4CL-Familie sein, die ausschließlich in Dikotyledonen zu finden sind.

Diese Tatsache wirft natürlich die Frage nach der Gewebe- und Stimulus-spezifischen Expression auf. Inwieweit spiegelt die mRNA-Akkumulation eine Sonderstellung der *At4CL4* in *A. thaliana* wider?

4.2.5 Gewebe- und Stimulus-spezifische Expressionsanalysen

Im Vergleich zu den beiden anderen Klasse I-Vertretern *At4CL1* und *At4CL2* ließ sich *At4CL4* mRNA nicht über Northern-Analysen verschiedener Gewebe nachweisen. Das gleiche Bild ergab sich bei der Analyse von RNA aus Pathogen-infizierten Pflanzen sowie aus UV-bestrahlten Zellen einer Suspensionskultur. Das Expressionsniveau von *At4CL4* ist offenbar entweder sehr niedrig oder aber auf sehr spezifische Gewebe oder Zelltypen limitiert. Dies deckt sich mit bislang bekannten Tatsachen. Es konnte erst in der jüngsten Ausgabe der EST-Daten ein *At4CL4*-Klon identifiziert werden, und in mehreren gezielten Versuchen zur Isolierung von *At4CLs* aus cDNA-Banken wurden keine *At4CL4*-Klone gefunden (Trezzini *et al.* 1993; Lee *et al.*, 1995; Büttner, 1998). Alle weiteren Analysen wurden daher mittels der wesentlich sensitiveren RT-PCR durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass *At4CL4* in den oberirdischen Teilen der Pflanze exprimiert wird (Abbildung 23, Kapitel 3.2.5, Seite 85). In steril angezogenen Wurzeln einer Flüssigkultur konnte kein *At4CL4*-Transkript nachgewiesen werden. mRNA der *At4CL2*, der Isoform, aus der *At4CL4* wahrscheinlich direkt über Duplikation hervorging, akkumuliert hauptsächlich in Wurzeln. Diese unterschiedliche Gewebe-Expression stützt das oben diskutierte Modell der komplementären "loss-of-function"-

Mutationen, (Kapitel 4.1.6) die zur Fixierung duplizierter Genen in der Evolution führen.

Die Ergebnisse der Licht- und Elicitor-responsiven Akkumulation der Transkriptmengen (Abbildung 24, Kapitel 3.2.5, Seite 85) von *At4CL1*, *At4CL2* und *At4CL3* deckten sich mit bereits bekannten Daten (Ehltting *et al.*, 1999). Somit war das Experiment geeignet, den Einfluss dieser Stimuli auf die *At4CL4*-Expression zu untersuchen. Während Elicitor nur eine sehr schwach induzierende Wirkung zeigte, wurde *At4CL4* ähnlich zu *At4CL1* und *At4CL2* durch UV-Licht schnell und transient aktiviert. Wie bei *At4CL2* nachgewiesen, wurde das Transkriptniveau weiter erhöht durch parallele Behandlung der bestrahlten Zellen mit Elicitor. Die hier untersuchte Stress-induzierte Transkript-Akkumulation von *At4CL4* ist ähnlich zu *At4CL1*, noch deutlicher aber mit der phylogenetisch näher verwandten *At4CL2* zu vergleichen. Eine Sonderstellung der *At4CL4* in dieser Hinsicht konnte mit den hier untersuchten Stimuli nicht nachgewiesen werden, jedoch wurde die evolutionäre Position von *At4CL4* in der Klasse I der 4CLs klar bestätigt.

4.3 *In vivo* Analysen

4.3.1 Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung von *At4CL*-Nullmutanten

Mutanten mit reduzierter Aktivität von Enzymen sind wertvolle Werkzeuge zur Aufklärung der *in vivo* Funktion der Enzyme in ihren Stoffwechselwegen. In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Ansätze zur Identifizierung und Beschreibung von transgenen 4CL-Linien durchgeführt. So führte "anti-sense"-Suppression der 4CL-Aktivität in *A. thaliana* zu einer Änderung der Ligninzusammensetzung (Lee *et al.*, 1997), während "sense"-Suppression in transgenen Tabaklinien eine allgemeine Reduktion des Ligningehaltes ergab (Kajita *et al.*, 1996). Eine weitergehende Analyse der Effekte wurde bislang in keinem Organismus beschrieben. Ebenso ist ein entscheidender Nachteil der Suppression auf transkriptioneller Ebene, dass es sich nur um die Reduktion, nicht aber die vollständige Unterdrückung der Translation der mRNA handelt. Eine unvollständige Inaktivierung kann dazu führen, dass die verbleibende Restaktivität des Enzyms die biologische Funktion ganz oder zumindest teilweise erfüllt.

Aus diesem Grund bestand ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Isolierung von Mutanten ohne transkriptionelle Restaktivität auf genomischer Ebene. Diese sogenannten Nullmutanten sind geeignet, die Bedeutung der einzelnen Gene und der umgesetzten Substrate funktionell *in vivo* zu untersuchen. Ebenso lassen sich mit Hilfe der Kombination zu Mehrfach-Mutanten Funktionen der gesamten Familie untersuchen. In die Untersuchung und Kombination von *At4CLs* zu Mehrfachmutanten wurden zwei weitere, bereits charakterisierte Nullmutanten des Phenylpropanstoffwechsels mit einbezogen. Sowohl die Mutante der Chalconsynthase *AtCHS* (*tt4*) als auch diejenige der Ferulat-5-Hydroxylase *AtF5H*

(fah1-2) besitzen als Mutanten eines Einzelkopie-Gens jeweils einen charakteristischen Phänotyp.

Der starke biochemische Phänotyp und die hier charakterisierte Mutation machen die Linie fah1-2 mit der Mutation im F5H-Gen im Zusammenhang mit Kombinationen der At4CLs wertvoll für die Analyse der Enzym *in vivo*-Funktionen. Mit der AtF5H, der At4CL1 und der At4CL2 sind drei Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels definiert, über die nach dem postulierten Modell an unterschiedlichen Positionen der gesamte Metabolitenfluss zu Lignin-Vorläufern und zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen abläuft. Die Kombination der drei Nullmutanten könnte somit entweder durch einen homozygot mutmaßlich letalen Phänotyp der Tripelmutante das Modell untermauern oder die Existenz alternativer Stoffwechselfluss-Routen aufdecken

Die AtCHS-Nullmutante tt4 wurde in die Analysen aufgenommen, da hier bereits gezeigt wurde, dass die Mutation in der AtCHS den Fluss von Phenylpropanen in den Stoffwechselweg der Flavonoide unterbricht. Die Kombination der tt4 mit den At4CL1 und At4CL2-Nullmutanten sollte nach dem bekannten Modell einen Phänotyp zeigen, der der At4CL1/At4CL2/At4CL3-Tripel-Mutante gleicht, und damit eine unabhängige Verbindung der Mutationen mit dem Phänotyp nachweisen.

4.3.2 Untersuchungen der Mutanten

Für alle At4CL-Gene konnte mindestens je eine Nullmutante aus den verschiedenen Populationen identifiziert und isoliert werden. Im Nachhinein zeigte die Durchsichtung der ZIGIA-Population und die Arbeit mit den dort identifizierten Mutanten-Linien im Vergleich mit modernen Populationen mehrere entscheidende Nachteile. Die Mutanten dieser Population tragen Insertionen mobiler Transposons und sind daher normalerweise nicht stabil. Eine physikalisch nah mit dem Ziel-Gen verknüpfte Insertion ist nur mit erheblichem Aufwand zu bereinigen, ebenso hoch kann der Aufwand sein, aus einer Insertionslinie eine stabile Mutante zu isolieren. Bis zu 25 weitere Transposons können sich im Hintergrund des Genoms dieser Linien befinden und erzeugen durch ihre Aktivität kontinuierlich weitere Mutationen. Weiter tragen diese Linien keinen Resistenzmarker, der Kreuzungen und Segregationsanalysen ermöglichen würde. Eine detaillierte Untersuchung von Linien der ZIGIA-Population wurde daher nur mit der Z14cl1-Linie durchgeführt, die bereits als stabilisierte *footprint*-Linie von J. Hagemeyer und im Laufe dieser Arbeit von Transposons bereinigt wurde.

Keine der Einzel-Nullmutanten zeigte einen offensichtlichen, morphologischen Phänotyp. Diese Beobachtung kann darauf zurückzuführen sein, dass geeignete Bedingungen, in denen die At4CLs spezifische, nicht-redundante Funktionen erfüllen, nicht getestet wurden.

Im Weiteren werden die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung, die im Anschluss durchgeführt wurde, diskutiert.

Die *At4CL1*-Nullmutation

Erst spät in dieser Arbeit wurde der biochemische Phänotyp der Z14cl1-Nullmutante untersucht. Es zeigte sich, dass in steril angezogenen Wurzeln dieser Linie spezifisch eine geringe Menge einer Verbindung akkumulierte, deren UV-Spektrum ähnlich dem des Standards Cumarin war. Es könnte sich hierbei um Derivate der in 1-Position zyklisierten 4-Cumarsäure handeln, wobei das UV-Spektrum der einfachsten Verbindung, Umbelliferon, ein 7-Hydroxy-Cumarin mit der ursprünglichen 4-Hydroxygruppe der 4-Cumarsäure, aber noch weiter von der unbekanntem Verbindung abweicht. Eine weitere Verbindung, deren UV-Spektrum ähnlich dem der Substanz war, die in den Proben der Z14cl1-Nullmutante auftrat, war die Prokatechinsäure. Hierbei handelt es sich um das Oxidationsprodukt der Kaffeesäure, in der die Seitenkette der Phenylpropansäure bis zur Benzoessäure verkürzt wurde. Durch die niedrige Menge, die in den Extrakten nachweisbar war, gestaltete sich die Zuordnung schwierig. Obige Spekulationen müssen noch durch Isolierung der Substanz bestätigt werden. Daher wurde die Struktur der Verbindung bislang noch nicht endgültig aufgeklärt.

Ein möglicher Grund für das Vorkommen dieser Substanz könnte mit einer Detoxifizierung der durch die *At4CL1*-Mutation hervorgerufene Akkumulierung von 4-Cumarat oder 4-Cumarat-Derivaten zusammenhängen.

Die *At4CL2*-Nullmutation

Es konnte für die Nullmutante SL4cl2 kein biochemischer Phänotyp nachgewiesen werden. Der Grund hierfür liegt zum Einen womöglich in der funktionellen Redundanz mit der *At4CL1*,

kann aber auch darauf zurückzuführen sein, dass die Bedingungen oder die Gewebe, in denen *At4CL2* eine spezifische Funktion ausübt, nicht untersucht wurden. Es wurde zwar spekuliert (Ehltling *et al.*, 1999), dass *At4CL2* für die Synthese von wurzelspezifischen Ligninen verantwortlich ist, in den Analysen der löslichen Sekundärmetabolite sowie den nach Hydrolyse zugänglichen Zellwandgebundenen Verbindungen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Kein Unterschied zu Wildtyp-Mustern war erkennbar. Eine ebenso analysierte Probe von Wurzel-Gewebe nach Infektion mit *P. sylvaticum* zeigte keinen Unterschied zu parallel kultiviertem Wildtyp.

Dies bedeutet, dass unter den untersuchten Bedingungen *At4CL2* von *At4CL1*, eventuell auch *At4CL4* funktionell ersetzt werden kann. Dies muss nicht zwangsläufig in exakt dem gleichen Gewebe stattfinden, ein Transport von Vorläufern aus benachbartem Gewebe oder angrenzenden Zellen, die durch andere Isoformen aktiviert wurden, wäre auch denkbar.

Die *At4CL3*-Nullmutation

Die Analyse löslicher Sekundärmetabolite aus *At4cl3*-Nullmutanten-Linien zeigte, dass der Gehalt an Flavonoiden im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen reduziert war. Ein vollständiges Fehlen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, ein Hintergrundniveau an Flavonoiden wurde detektiert. Wie bereits oben diskutiert, kann dies auf eine (hier partielle) funktionelle Redundanz der anderen Isoformen zurückzuführen sein. Es zeigte sich jedoch, dass im Fall der *At4CL3*-Nullmutation die

Funktion der ausgefallenen Isoform nur teilweise ersetzt werden kann. Die Synthese von Flavonoid-Vorläufern für den Schutz vor UV-Strahlung ist offenbar eine spezielle, vermutlich die Haupt-Aufgabe der *At4CL3*. Untermauert wird diese spezifische Funktion durch die Expression von *At4CL3* in der Epidermis, wie es durch transgene *A. thaliana At4CL3*-Promotor::GUS-Linien gezeigt werden konnte (E. Kombrink, pers. Mitteilung). Die Funktionen der anderen Isoformen sind, demonstriert durch die vorhergehenden Analysen (Ehrling *et al.*, 1999) und diese Arbeit, von der der *At4CL3* am weitesten entfernt. Die spekulierte Rolle der *At4CL3* in der Synthese von Flavonoid-Vorstufen konnte somit bestätigt werden. Hier konnte aber auch demonstriert werden, dass, obwohl *At4CL3* für die UV-induzierbare Synthese von Flavonoid-Vorstufen verantwortlich ist, die Aktivität der anderen Isoformen ausreicht, um den Verlust der *At4CL3*-Funktion teilweise zu ersetzen. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, dass für die *At4CL3*-Nullmutante kein tt4-Phänotyp gefunden wurde (Abbildung 33, Kapitel 3.5.1, Seite 105). In löslichen Extrakten von *At4CL3*-Samen zeigte sich dies am deutlichsten, hier wurden im Vergleich zum Wildtyp fast identische Mengen an Flavonoiden nachgewiesen. Die Kompensation der *At4CL3*-Nullmutation scheint auch in ausgewachsenen Pflanzen ein höheres Niveau zu erreichen als in jungem Gewebe. Hier würde man auch eine verstärkte Aktivität der Ligninvorstufen-aktivierenden *At4CL1*, *At4CL2* und *At4CL4* vermuten. Welche der Isoformen für die nachgewiesene Akkumulation von Flavonoiden verantwortlich ist, werden Kombinationen von Mehrfachmutanten der *At4CL3* mit den anderen Mitgliedern der Gen-Familie aufdecken.

Eine der physiologischen Funktionen von Flavonoiden ist der Schutz von Gewebe vor UV-induzierten Schäden. Die Reduktion von Flavonoiden verringert daher auch die Menge an UV-absorbierenden Pigmenten. Obwohl eine starke Reduktion im Gewebe junger *At4CL3*-Nullmutantenlinien nachgewiesen wurde, konnte keine Verringerung der Biomasse in der normalen Entwicklung und nach UV-Stress gezeigt werden. Dies kann auf ein ausreichendes Hintergrundniveau an Flavonoiden zurückzuführen sein, das durch die Aktivität der anderen Isoformen erzeugt wird, ebenso aber stellen Sinapat-Derivate eine weitere Klasse von Verbindungen mit putativer UV-Schutzfunktion dar. Diese werden ebenfalls über den Phenylpropanstoffweg synthetisiert. Eine Mutante dieses Stoffwechselwegs ist die *AtF5H*-Nullmutante *fah1-2*, in der keine Akkumulation von Sinapat-Derivaten nachzuweisen ist. Eine Kombination der *fah1-2* mit den *At4CL*-Nullmutanten wird in weiteren Experimenten helfen, das jeweilige UV-Schutz-Potenzial der beiden Klassen, Flavonoide und Sinapat-Derivate, zu interpretieren.

Die *At4CL4*-Nullmutation

Eine Nullmutante des *At4CL4*-Gens wurde erst gegen Ende der Arbeit isoliert. Hier war ebenfalls kein morphologischer Phänotyp zu beobachten. Eine erste biochemische Charakterisierung verschiedener Gewebe zeigte keine Unterschiede zu Wildtyp-Linien, sodass auch ein biochemischer Phänotyp bislang nicht nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Funktion der *At4CL4* im Stoffwechsel zur Synthese von Ligninvorstufen oder Sinapat-Vorstufen wird weiter unten im Kapitel der Mehrfachmutanten beleuchtet. Anhand der Einzel-Nullmutation war jedoch keine Ausnahmeposition der *At4CL4* zu belegen, eine Kompensation des

Verlusts an At4CL4-Enzymaktivität wird vermutlich wie im Fall der At4CL2 durch die anderen Klasse I-Isoformen stattfinden. Betrachtet man die Expressionsniveaus der einzelnen Mitglieder, so erscheint es plausibel, dass in der At4CL1-Nullmutante ein schwacher biochemischer Phänotyp, wie er oben beschrieben wird, nachweisbar ist, wohingegen die schwächer exprimierte At4CL2 bereits vollständig ersetzt werden kann. Im Fall der sehr niedrigen Expression der At4CL4 ist die Kompensation daher umso wahrscheinlicher.

Auch hier werden in der Zukunft multiple Mutanten helfen, die Funktion der At4CL4 weiter aufzuklären und nachzuweisen, welche der Isoformen die Funktion der At4CL4 in der Nullmutante ersetzen kann.

4.3.3 Charakterisierung einer Mehrfachmutante

Basierend auf dem Modell des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels erschienen zu Beginn der Arbeit mehrere Kombinationen von Doppel- und Tripel-Mutanten vielversprechend, um die funktionellen Redundanzen der At4CL-Gene zu überwinden. Am attraktivsten war die Kombination der Einzelnullmutanten von At4CL1, At4CL2 und At4CL3 zu einer homozygoten Tripelmutante, die alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Isoformen abdeckt. Im Laufe der Arbeit wurde nicht nur die vierte Isoform At4CL4 identifiziert, die die Familie der At4CLs höchstwahrscheinlich vervollständigt, sondern die anfängliche Fragestellung der *in vivo*-Funktionsanalyse wurde auch erweitert. Nullmutanten von insgesamt sechs Genen des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels wurden eingesetzt, um möglichst viele strategische Punkte innerhalb des Stoffwechsels zu erfassen. Da bereits früh mit der At4CL3-Nullmutante gezeigt werden konnte, dass At4CL3 als einzige Klasse II-Isoform eine Sonderstellung einnahm, konnten die Auswirkungen der Nullmutation auf die Synthese von Flavonoid-Derivaten detailliert untersucht werden. Daher wurde der zweite Schwerpunkt der Arbeit mit Mutanten auf die Erzeugung einer Mutante gelegt, mit deren Hilfe der zweite Ast analysiert werden sollte, der vom allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel ausgeht: die Synthese von Lignin- und Zellwand-gebundenen phenolischen Vorstufen.

Nach dem Modell des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (Abbildung 1, Kapitel 1.1.5, Seite 16) liegen die Enzyme der Gene AtF5H, At4CL1 und At4CL2 an Schlüsselpositionen. Die Synthese von Lignin-Vorstufen und allen weiteren C6-C3 Verbindungen des Phenylpropanstoffwechsels sollte über diese drei Enzyme ablaufen. Eine Untersuchung verschiedener Kombinationen der Nullmutanten dieser Schlüssel-Gene sollte die anhand von *in vitro*-Daten postulierten Positionen der Enzyme im *in vivo*-Stoffwechsel nachweisen oder erweitern. Die Kombination der Nullmutanten aller drei Gene sollte somit die Kontrolle über den gesamten Stoffwechsel der Lignin- und Zellwand-gebundenen phenolischen Vorstufen demonstrieren.

Ausgangspunkt der Analysen waren segregierende Populationen mehrerer heterozygoter Linien von Zl4cl1/SL4cl2/fah1-2-Nullmutanten. Erste Versuche und die molekularbiologische Charakterisierung hatten bereits gezeigt, dass homozygot mutierte Allele von Zl4cl1 und SL4cl2 miteinander kombiniert einen retardierten

Wuchs älterer Pflanzen verursachen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Entwicklung der Pflanzen auf der Altersstufe von etwa 5 Wochen stehenblieb, während bei den Wildtyp-Linien die primären und sekundären Sprossachsen ihre volle Länge erreichten. Eine direkte Verbindung der Mutationen mit dem Phänotyp wurde vermutet, da in diesem Alter verstärkt Lignin-Bildung für die volle Ausbildung der Sprossachsen erforderlich ist. Weitere morphologische und histochemische Untersuchungen des Phänotyps werden in Zukunft zusätzliche Merkmale nachweisen, die durch die Mutationen verursacht werden.

Eine biochemische Analyse sollte mögliche Hinweise zur Erklärung des beobachteten Phänotyps geben. Mit Hilfe von HPLC wurden methanolische Extrakte löslicher Sekundärmetabolite sowohl von homozygoten *At4CL1/At4CL2*-Nullmutanten als auch von Mutantenlinien, in denen die homozygote Tripelmutation vorlag, analysiert. Als Kontrolle dienten jeweils Doppel-Mutanten, die das dritte Allel heterozygot trugen.

In den Proben der *fah1-2*-Nullmutante konnten wie erwartet weder Sinapat-Derivate noch eine Akkumulation von *AtF5H*-Edukten nachgewiesen werden. In den Extrakten der homozygoten Tripel-Mutante *ZI4cl1/SL4cl2/fah1-2* wurden drei für diese Mutante spezifische Peaks identifiziert. Durch Vergleiche mit UV-Spektren von Standards wurde die Vermutung nahe gelegt, es handele bei diesen Verbindungen um Derivate der 4-Cumarsäure und der Ferulasäure, den Edukten der mutagenisierten Enzyme. In den Extrakten der homozygoten Doppel-Mutante *ZI4cl1/SL4cl2* mit zumindest einem intakten *AtF5H*-Allel wurden die drei oben beschriebenen Verbindungen ebenfalls identifiziert. Dieses Resultat wirft weitere Fragen zu der Funktion der *AtF5H* auf. Da die Sinapat-Konzentrationen in dieser Linie mit denen des Wildtyps übereinstimmten, erfüllte die *AtF5H* ihre natürliche Aufgabe, die Synthese von Sinapat-Vorstufen, dies jedoch, ohne die Mengen an akkumulierendem Ferulat zu reduzieren. Dies könnte mehrere Gründe haben. Die prinzipielle Möglichkeit, dass das Enzym die beobachteten hohen Mengen an Sinapat-Vorläufern erzeugen kann, dann jedoch keine weitere Kapazität für die Umsetzung der gering erhöhten Menge an Ferulat, ihrem putativen Substrat, mehr aufweist, ist nicht plausibel. Daher kann spekuliert werden, dass entweder Ferulat oder das hier in derivatisierter Form vorliegende Ferulat kein Substrat für die *AtF5H* darstellt, sondern dass sie möglicherweise ihre Funktion im Stoffwechselweg auf der Ebene bereits aktivierter Vorstufen ausübt. Dies würde implizieren, dass die Aktivität der *At4CL3* oder eher der *At4CL4* in der homozygoten Doppel-Mutante *ZI4cl1/SL4cl2* ausreichend ist, genügend aktivierte Vorstufen für die Synthese der beobachteten Sinapat-Derivate bereitzustellen.

Der oben beschriebene Phänotyp könnte direkt durch die Akkumulation von Zimtsäure-Derivaten hervorgerufen werden, die als toxisch gelten. Aus diesem Grund sind die in pflanzlichen Geweben nachzuweisenden Verbindungen üblicherweise derivatisiert durch die Kopplung an z.B. Zucker, Maleinsäure oder Cholin. Die glykosylierte Form stellt häufig die Transportform oder Lagerform von anderen Phenylpropanen in der Vakuole dar. Die UV-Spektren deuteten zwar auf Zimtsäure-Derivate hin, die Retentionszeiten der Verbindungen in den HPLC-Läufen gaben jedoch weitere Hinweise darauf, dass die Verbindungen bereits verestert

vorlagen. Diese Reaktion kann möglicherweise von cytosolischen Enzymen katalysiert werden, die ebenfalls Sinapinsäure derivatisieren sollen. Vier dieser Enzyme (Hydroxycimtsäure-Transferasen) wurden bereits in *A. thaliana* identifiziert: SGT (Sinapat- oder HCA GT, Hydroxycimtsäure-Glucosyltransferasen, Milowski *et al.*, 2000), zusätzlich zu der bereits charakterisierten SMT (Sinapat Malattransferase, Lehfelddt *et al.*, 2000). Besonders auffallend ist hier, dass eine der Isoformen (AtHCA GT3) die höchste Spezifität zu 4-Cumarat und Sinapat zeigte, Substrate, die unter physiologischen Bedingungen in *A. thaliana*-Gewebe nicht nachweisbar waren. Die Isolierung und Strukturaufklärung der in den *A. thaliana* Nullmutanten akkumulierenden Verbindungen können diese Fragen in Zukunft klären.

Eine Erklärung des beobachteten Phänotyps der At4CL1/ At4CL2-Nullmutante auf Grund der vorläufigen Ergebnisse der biochemischen Untersuchung könnte auch die mangelnde Fähigkeit der Pflanzen sein, Lignin- und phenolische, zellwandgebundene Verbindungen aufzubauen. Da Lignin nicht nur wichtig für die strukturelle Integrität der Sprossachsen ist, sondern auch durch hydrophobe Eigenschaften in den Leitbündeln mitverantwortlich ist für den Wassertransport, könnte der beobachtete Phänotyp bedeuten, dass Pflanzen mit Lignindefizienz größenlimitiert sind. Kollabieren der Leitbündel, wie es bereits für transgene Tabaklinien mit unterdrückter CAD (Zimtsäure:CoA Reduktase) demonstriert wurde (Piquemal *et al.*, 1998), könnte eine der Konsequenzen sein, die weiteres Wachstum über eine Schwelle hinaus begrenzt. Ebenso denkbar wäre eine durch das fehlende Lignin reduzierte physikalische Stabilität der Sprossachsen. Es wurde bereits beschrieben, dass Pflanzen in gewissem Rahmen in der Lage sind, Lignindefizite zu kompensieren. Dies kann entweder auf der Stufe der Monomer-Zusammensetzung geschehen, wie es z.B. beschrieben wurde für eine Anhebung des H-Monomergehalts in 4CL-"anti-sense"-supprimiertem transgenen Tabak (Kajita *et al.*, 1997), eine Anhebung des S-Monomergehaltes in F5H überexprimierenden transgenen Pappeln (Franke *et al.*, 2000) oder aber für eine Erhöhung des Zellulose-Gehalts, wie es in transgenen 4CL-"antisense"-supprimierten Espen (Hu *et al.*, 1999) gezeigt wurde. Das häufigste Problem der Interpretation der Phänotypen solcher Linien war bislang die Restaktivität der supprimierten Enzyme. Was genau auf biochemischer Ebene in den hier erzeugten und beschriebenen At4CL-Nullmutanten den Phänotyp bewirkt, kann in Zukunft detailliert über Histochemie und Ligninanalytik untersucht werden.

Besondere Fragestellungen werden dabei in Zukunft sicher von großem Interesse sein:

In welchem Ausmaß ist eine Ligninreduktion kompatibel mit normaler Entwicklung der Pflanze und bis zu welchem Umfang toleriert die Pflanze Änderungen der Ligninzusammensetzung?

Welchen Einfluss hat eine Ligninreduktion auf die primären Zellwände und die Zell-Expansion?

Kann die polymere Struktur des Lignins möglicherweise aus mehr als den drei bekannten, konventionellen Monomeren aufgebaut werden?

5 Zusammenfassung

Die Synthese der Flavonoide und der Hydroxyzimtsäure-Derivate, zwei Klassen pflanzlicher Sekundärmetabolite, geht von einem zentralen Stoffwechselweg, dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel aus. *In vitro* Untersuchungen in *A. thaliana* bildeten die Grundlage eines Modells, nach dem die Familie der 4-Cumarat:CoA Ligasen zentrale Positionen an den Abzweigungen in die beiden Unterstoffwechselwege besetzen (Ehltling *et al.*, 1999).

Ziel des Projekts war die Aufschlüsselung der Funktionen der drei zu diesem Zeitpunkt bekannten Isoformen der *A. thaliana* 4-Cumarat:CoA Ligasen *in vivo*.

Detaillierte *in silico* Untersuchungen führten in dieser Arbeit zur Entdeckung einer weiteren Isoform, *At4CL4*. Anhand von phylogenetischen und genomischen Analysen konnte die *At4CL4* nicht nur der Klasse I-4CLs zugeordnet werden, sondern auch ein Modell vorgeschlagen werden, das die Evolution der *At4CL*-Familie in *A. thaliana* beschreibt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnte postuliert werden, dass die Familie der *At4CLs* mit den vorliegenden vier Isoformen vollständig ist.

Die Isoform *At4CL4* wurde heterolog exprimiert und enzymkinetisch als *bona fide* 4CL charakterisiert. Zu diesem Zeitpunkt war die *At4CL4* die erste klonierte und heterolog exprimierte 4CL, die *in vitro* die Aktivierung von Sinapinsäure katalysierte. Heute teilt sich die *At4CL4* diese Sonderstellung mit der kürzlich publizierten Soja *Gm4CL1* (Lindermayer *et al.*, 2002). Der *At4CL4*-katalysierten Aktivierung von Sinpinsäure bzw. Ferulasäure könnte eine Rolle im Stoffwechselweg zu den Sinpat-Derivaten oder Ligninvorstufen zukommen.

Mit Expressionsanalysen auf RT-PCR Ebene wurde die mRNA-Akkumulation der *At4CLs* in unterschiedlichen Geweben sowie nach UV- und Elicitor-Behandlung von Suspensionszellkultur untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *At4CL4* sehr schwach exprimiert wird, grundsätzlich aber ein Muster ähnlich zu den beiden anderen Klasse I-Isoformen *At4CL1* und *At4CL2* besitzt. Dieses Resultat untermauert zum Einen ihre Position im Stammbaum und lässt zum Anderen eine *in vivo* Funktion assoziiert mit der Synthese von Ligninvorstufen und anderen phenolischen Verbindungen erwarten.

Zu Beginn der Arbeit lag bereits eine *At4CL1*-Nullmutante aus einer Transposonpopulation vor (J. Hagemeier, MPI für Züchtungsforschung). Der genomische Hintergrund dieser Linie wurde vollständig von Transposons befreit. Zu jedem weiteren Mitglied der *At4CL*-Familie wurde mindestens eine stabile Nullmutante isoliert, molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert.

Für keine der Einzel-Nullmutanten konnte eine morphologische Veränderung des Habitus gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden.

Von den Klasse I-Isoformen war nur in methanolischen Extrakten löslicher Sekundärmetabolite aus Wurzeln der *At4CL1*-Nullmutante eine Veränderung des HPLC-Profiles gegenüber dem Wildtyp nachweisbar. Die geringe, wenn auch spezifische Akkumulation einer bislang unbekanntes Verbindung, mit einem UV-Spektrum ähnlich dem des Cumarins, wurde nachgewiesen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Klasse I-Isoformen *in vivo* unter den hier vorherrschenden Bedingungen redundante Funktionen ausüben und den Verlust eines Mitglieds kompensieren können.

In den HPLC-Profilen der *At4CL3*-Nullmutante konnte eine Reduktion, nicht aber vollständiges Fehlen von Flavonoiden nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung des *At4CL3*-Nullmutanten-Phänotyps in verschiedenen Organen und Entwicklungsstufen unterschiedlich stark war. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte keine UV-induzierbare Akkumulation von Flavonoiden in der *At4CL3*-Nullmutante nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Aufgabe der einzigen *A. thaliana* Klasse II-4CL, *At4CL3*, in der Aktivierung von Flavonoid-Vorstufen besonders in jungen Pflanzen und nach UV-Perzeption besteht. In älteren Pflanzen und in bestimmten Geweben kann die Funktion der *At4CL3* jedoch von anderen Isoformen partiell oder sogar vollständig übernommen werden, wie anhand der HPLC-Profile von Samen gezeigt wurde.

Um die hier nachgewiesenen funktionellen Redundanzen zu überwinden, wurden multiple Nullmutanten durch Kombination der in dieser Arbeit isolierten *At4CL*-Einzel-Nullmutanten generiert. Zwei weitere, nicht selbst hergestellte Mutanten der Gene *AtCHS* und *AtF5H* wurden hinzugezogen, um möglichst viele strategische Punkte des Metabolitenflusses im Phenylpropanstoffwechsel abzudecken.

Die morphologische und biochemische Charakterisierung von Nachkommen der ausgewählten *At4CL1/At4CL2/AtF5H*-Tripel-Mutante zeigte, dass ein homozygoter Defekt von *At4CL1* kombiniert mit *At4CL2* zu einem Stagnieren der pflanzlichen Entwicklung im Alter von 5-6 Wochen führte. In HPLC-Profilen dieser homozygoten Doppelmutante konnte die Akkumulation von drei, in Wildtypelinien nicht nachweisbaren Verbindungen gezeigt werden, die vermutlich 4-Cumarat- und Ferulat-Derivate darstellen. Die Analyse zeigte, dass dieser Defekt in jungen Pflanzen durch die Funktion von *At4CL3* und/oder *At4CL4* ausgeglichen werden kann. In der weiteren Entwicklung jedoch kann die verstärkte Ligninifizierung zu einem hohen Bedarf an aktivierten Vorstufen führen, der nicht mehr gedeckt werden kann. Daraus wurde geschlossen, dass die Funktionen von *At4CL1* und *At4CL2* in der Synthese von Vorstufen des Lignins und weiteren phenolischen Verbindungen der späten Entwicklungsstadien bestehen.

Weiter konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle *AtF5H* die in der *At4CL1/At4CL2*-Doppel-Nullmutante akkumulierenden Verbindungen nicht verwerten kann. Möglicherweise katalysiert *AtF5H* daher keine Umsetzungen auf der Stufe der Hydroxyzimtsäuren sondern später im Stoffwechsel auf der Ebene der CoA-aktivierten Hydroxyzimtsäure-, der Hydroxyzimtaldehyd- oder der Hydroxyzimtalkohol-Derivate. Eine mögliche Schlussfolgerung hieraus war, dass die

AtF5H-abhängige Synthese der Sinapat-Derivate Vorstufen einschließt, die über At4CL3 oder At4CL4 aktiviert werden.

Basierend auf der Interpretation der mit Hilfe der Nullmutanten gewonnenen Informationen wurden *in vivo* Funktionen der At4CLs abgeleitet. Das zu Beginn der Arbeit zugrunde gelegte Modell des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels konnte mit diesen *in vivo*-Daten untermauert, präzisiert und erweitert werden. Detaillierte und tieferegehende Analysen der Nullmutanten können in Zukunft weitere Informationen hinzufügen und die Beschreibung der hier postulierten Funktionen erweitern.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ansatzweise die komplexen Wechselwirkungen und das Zusammenspiel einzelner Enzyme einer Multi-Genfamilie beleuchtet. Im folgenden Abschnitt sollen kurz die Perspektiven von vier Gebieten angesprochen werden, die sich aus dieser Arbeit ergaben und in Zukunft von weiterer Bedeutung sein können.

Die detailliertere Funktionsanalyse kombinierter Nullmutanten kann der *in vivo* Aufgabe der At4CL-Familie weitere Facetten hinzufügen. Neben der Bedeutung für die Entwicklung bestehen weitere Aufgaben von Lignin und Zellwand-gebundenen phenolischen Verbindungen in der Abwehr von Pathogenen. Der Aufbau präformierter Barrieren gegen Infektionen, die induzierte Synthese von Botenstoffen für die systemische Resistenz und die rasche Synthese phenolischer Verbindungen zur Verstärkung der Zellwand nach Erkennung eines Pathogens sind Beispiele der Bedeutung von Zimtsäurederivaten in der pflanzlichen Pathogenabwehr. Mit der Kombination der Nullmutanten von At4CL1 und At4CL2, deren Gene beide durch Pathogen-Infektion transkriptionell stark aktiviert werden, kann der Zusammenhang der Synthese phenolischer Verbindungen mit pflanzlicher Verteidigung *in vivo* untersucht werden.

Biochemische Komplementation durch Gabe von löslichen Lignin- oder Flavonoid-Vorstufen könnte die Mutationen in At4CL1/At4CL2 bzw. At4CL3 mit den Phänotypen verknüpfen. Genetische Komplementation ist jedoch eine elegantere Strategie, die sich hierfür anbietet, die aber auch zudem noch die Möglichkeit eröffnet, im pflanzlichen Nullmutanten-Hintergrund veränderte Varianten von 4CLs auf ihre Eigenschaften zu testen, die über die Komplementation des Phänotyps hinausgehen können. Die Mutanten können in Zukunft die Basis zur Erzeugung transgener, 4CL-exprimierender Linien unter der Kontrolle endogener oder synthetischer Promotoren darstellen. Hier könnte die heterologe Expressierung der putativen Klasse I-Pp4CL aus dem ligninfreien Moos *P. patens* zeigen, inwieweit funktionelle Redundanz zu den Blütenpflanzen-4CLs besteht.

Die genomischen Informationen von *A. thaliana* waren in dieser Arbeit Ausgangspunkt zur Identifikation des mutmaßlich letzten At4CL-Familienmitglieds. In den phylogenetischen Analysen wurden mehrere Gruppen von 4CL-ähnlichen Proteinen entdeckt, aber bedingt durch den relativen Unterschied der Sequenzen und speziellen Aminosäureaustauschen an Positionen, die für die Funktion der 4CLs bedeutend sind, kann davon ausgegangen werden, dass sie möglicherweise mechanistisch ähnlich arbeiten, funktionell aber eine andere Bedeutung haben. Die Aufklärung der Funktionen dieser 4CL-ähnlichen Proteine kann durch Nutzung bekannter Eigenschaften der 4CLs erleichtert werden.

Alle Untersuchungen dieser Arbeit fanden in einem Modellorganismus mit niedriger Komplexität der untersuchten Stoffwechselwege statt. Die gewonnenen Ergebnisse können auf weitere Pflanzen übertragen werden. Die Übertragung der hier gewonnenen Erkenntnisse auf weitere Organismen kann zum einen den Wert von *A. thaliana* als Modellsystem zur Untersuchung manipulierter Phenylpropanstoffwechselwege unterstreichen. Zum anderen können in weiteren Organismen in Verbindung mit deren spezifischen Eigenheiten weitere Erkenntnisse zu den Stoffwechselwegen gewonnen und genutzt werden. Im Anschluss an detaillierte Ligninanalytik der *A. thaliana*-Nullmutanten wäre ein Beispiel mit kommerzieller Bedeutung die gezielte Manipulation des Phenylpropanstoffwechsels in Bäumen. Durch Veränderung der 4CL-Aktivität könnten sich dort über gerichtete Modifikation der Ligninzusammensetzung die physikalischen Eigenschaften des Holzes modellieren lassen.

7 Literaturverzeichnis

- Allina, S. M., Prihadash, A., Theilmann, D. A., Ellis, B. E., and Douglas, C. J.** (1998). 4-Coumarate-Coenzyme a Ligase in Hybrid Poplar - Properties of Native Enzymes, cDNA Cloning, and Analysis of Recombinant Enzymes. *Plant Physiology* 116, 743-754.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-10.
- Anterola, A. M., and Lewis, N. G.** (2002). Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61, 221-294.
- Batz, O., Logemann, E., Reinold, S., and Hahlbrock, K.** (1998). Extensive Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism By Fungal Elicitor or Infection in Parsley Cells. *Biological Chemistry* 379, 1127-1135.
- Baulcombe D. C.** (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 32, 79-88.
- Baumann E., Lewald J., Saedler H., Schulz B., and Wisman E.** (1998). Successful PCR based reverse genetic screens using an En-1 mutagenised *A. thaliana* population generated via single-seed descent. *Theor. Appl. Genet.* 97: 729-734.
- Bell-Lelong, D. A., Cusumano, J. C., Meyer, K., and Chapple, C.** (1997). Cinnamate-4-Hydroxylase Expression in *Arabidopsis* - Regulation in Response to Development and the Environment. *Plant Physiology* 113, 729-738.
- Bennett Richard, N., and Wallsgrove Roger, M.** (1994). Tansley review No. 72: Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127, 617-633.
- Bharti, A. K., and Khurana, J. P.** (1997). Mutants of *Arabidopsis* as Tools to understand the Regulation of Phenylpropanoid Pathway and UVB Protection Mechanisms. *Photochemistry & Photobiology* 65, 765-776.
- Bhattacharya, D., Aubry, J., Twait, E. C., and Jurk, S.** (2000). Actin gene duplication and the evolution of morphological complexity in land plants. *Journal of Phycology* 36, 813-820.
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C., and Dixon, R. A.** (2000). Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* 122, 107-116.
- Borevitz, J. O., Xia, Y. J., Blount, J., Dixon, R. A., and Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12, 2383-2393.
- Bouché, N., and Bouchez, D.** (2001). *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 111-117.
- Boudet, A. M.** (2000). Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology & Biochemistry* 38, 81-96.
- Boudet, A. M.** (1998). A New View of Lignification. *Trends in Plant Science* 3, 67-71.
- Boudet, A. M., Lapierre, C., and Grima-Pettenati, J.** (1995). Tansley review no. 80: Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytologist* 129, 203-236.

- Brodelius P. E.** (1994). Phenylpropanoid metabolism in *Vanilla planifolia* Andr. (V) high performance liquid chromatographic analysis of phenolic glycosides and aglycones in developing fruits. *Phytochemical Analysis* 5, 27-31.
- Brosche, N., and Strid, A.** (2003). Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum* 117, 1-10.
- Burbulis, I. E., Iacobucci, M., and Shirley, B. W.** (1996). A Null Mutation in the First Enzyme of Flavonoid Biosynthesis Does Not Affect Male Fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8, 1013-1025.
- Burbulis, I. E., Pelletier, M. K., Cain, C. C., and Shirley, B. W.** (1996). Are flavonoids synthesized by a multi-enzyme complex? *Saas Bulletin, Biochemistry & Biotechnology* 9, 29-36.
- Burbulis, I. E., and Winkel-Shirley, B.** (1999). Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12929-12934.
- Cannon, M., Platz, J., O'Leary, M., Sookdeo, C., and Cannon, F.** (1990). Organ-Specific Modulation Of Gene Expression In Transgenic Plants Using Antisense Rna. *Plant Molecular Biology* 15, 39-48.
- Chabannes, M., Barakate, A., Lapierre, C., Marita, J. M., Ralph, J., Pean, M., Danoun, S., Halpin, C., Grima-Pettenati, J., and Boudet, A. M.** (2001). Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant Journal* 28, 257-270.
- Chapple, C. C., Vogt, T., Ellis, B. E., and Somerville, C. R.** (1992). An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4, 1413-24.
- Chapple, C. C. S.** (1995). A cDNA Encoding a Novel Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase From *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Physiology* 108, 875-876.
- Chapple C. C. S., Shirley Brenda, W., Zook, M., Hammerschmidt, R., and Somerville Shauna, C.** (1994). Secondary Metabolism in *Arabidopsis*. *Meyerowitz, E. M.* 27, 989-1030.
- Chong, J., Pierrel, M. A., Atanassova, R., Werck-Reithart, D., Fritig, B., and Saindrenan, P.** (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiology* 125, 318-328.
- Close, D. C., and McArthur, C.** (2002). Rethinking the role of many plant phenolics - protection from photodamage not herbivores? *Oikos* 99, 166-172.
- Colbert D.,** (2001) *Plant Physiology*, Vol. 126, 480-484.
- Cooper-Driver Gillian, A., and Bhattacharya, M.** (1998). Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* 49, 1165-1174.
- Cukovic, D., Ehltling, J., VanZiffle, J. A., and Douglas, C. J.** (2001). Structure and evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene families. *Biological Chemistry* 382, 645-654.
- Davison, A. W., and Barnes, J. D.** (1998). Effects of ozone on wild plants. *New Phytologist* 139, 135-151.

- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., and Wang, L. J.** (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective . *Molecular Plant Pathology* 3, 371-390.
- Dixon, R. A., and Paiva, N. L.** (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Dixon, R. A., and Steele, C. L.** (2000). Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering (vol 4, pg 394, 1999). *Trends in Plant Science* 5, 133.
- Douglas, C. J.** (1996). Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis - From weeds to trees . *Trends in Plant Science* 1, 171-178.
- Douglas, C. J., Hauffe, K. D., Ites-Morales, M. E., Ellard, M., Paszkowski, U., Hahlbrock, K., and Dangl, J. L.** (1991). Exonic sequences are required for elicitor and light activation of a plant defense gene, but promoter sequences are sufficient for tissue specific expression. *EMBO Journal* 10, 1767-75.
- Ebel, J., Schaller-Hekeler, B., Knobloch, K. H., Wellman, E., Grisebach, H., and Hahlbrock, K.** (1974). Coordinated changes in enzyme activities of phenylpropanoid metabolism during the growth of soybean cell suspension cultures. *Biochimica et Biophysica Acta* 362, 417-24.
- Ehlting, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C. J., Somssich, I. E., and Kombrink, E.** (1999). Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant Journal* 19, 9-20.
- Ehlting, J., Shin, J. J. K., and Douglas, C. J.** (2001). Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant Journal* 27, 455-465.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., and Somssich, I. E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors . *Trends in Plant Science* 5, 199-206.
- Fitch, W. M.** (1970). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic Zoology* 19, 99-113.
- Franke, R., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Humphreys, J. M., and Chapple, C.** (2002). Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 30, 47-59.
- Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., and Chapple, C.** (2002). The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal* 30, 33-45.
- Franke, R., McMichael, C. M., Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C., and Chapple, C.** (2000). Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant Journal* 22, 223-234.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R. L., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchinson, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J. P., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S. P., Colbert, M., Sun, W. L., Chen, L. L., and et al.** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp japonica). *Science* 296, 92-100.
- Guo, D. J., Chen, F., Inoue, K., Blount, J. W., and Dixon, R. A.** (2001). Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell* 13, 73-88.

- Gusmayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K., and Schmelzer, E.** (1998). Local Mechanical Stimulation Induces Components of the Pathogen Defense Response in Parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8398-8403.
- Hagemeier, J., Schneider, B., Oldham, N. J., and Hahlbrock, K.** (2001). Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with Virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 753-758.
- Hahlbrock, K., Knobloch, K. H., Kreuzaler, F., Potts, J. R., and Wellmann, E.** (1976). Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes. Light-induced synthesis of flavonoid glycosides in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *European Journal of Biochemistry* 61, 199-206.
- Harding, S. A., Leshkevich, J., Chiang, V. L., and Tsai, C. J.** (2002). Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate : coenzyme A ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. *Plant Physiology* 128, 428-438.
- Heath, M. C.** (2002). In this issue: secondary metabolites and plant defence. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 60, 273-274.
- Heath, R., McInnes, R., Lidgett, A., Huxley, H., Lynch, D., Jones, E., Mahoney, N., and Spangenberg, G.** (2002). Isolation and characterisation of three 4-coumarate:CoA-ligase homologue cDNAs from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Plant Physiology* 159, 773-779.
- Hemm, M. R., Herrmann, K. M., and Chapple, C.** (2001). AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV . *Trends in Plant Science* 6, 135-136.
- Howles, P. A., Sewalt, V. J. H., Paiva, N. L., Elkind, Y., Bate, N. J., Lamb, C., and Dixon, R. A.** (1996). Overexpression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase in Transgenic Tobacco Plants Reveals Control Points For Flux Into Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Physiology* 112, 1617-1624.
- Hu, W. J., Harding, S. A., Lung, J., Popko, J. L., Ralph, J., Stokke, D. D., Tsai, C. J., and Chiang, V. L.** (1999). Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology* 17, 808-812.
- Hu, Z.-A., and Wang, H.-X.** (1994). Discrepancy between molecular and morphological evolution of plants. *Chinese Journal of Botany* 6, 168-176.
- Humphreys, J. M., and Chapple, C.** (2002). Rewriting the lignin roadmap . *Current Opinion in Plant Biology* 5, 224-229.
- Humphreys, J. M., Hemm, M. R., and Chapple, C.** (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10045-10050.
- Inoue, K., Sewalt, V. J. H., Ballance, G. M., Ni, W. T., Sturzer, C., and Dixon, R. A.** (1998). Developmental Expression and Substrate Specificities of Alfalfa Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and Caffeoyl Coenzyme a 3-O-Methyltransferase in Relation to Lignification. *Plant Physiology* 117, 761-770.
- Jenkins, G. I.** (1997). Uv and Blue Light Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 20, 773-778.

- Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., and Noel, J. P.** (2000). Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature Structural Biology* 7, 786-791.
- Kajita, S., Katayama, Y., and Omori, S.** (1996). Alterations in the Biosynthesis of Lignin in Transgenic Plants With Chimeric Genes For 4-Coumarate-Coenzyme a Ligase. *Plant & Cell Physiology* 37, 957-965.
- Kajita, S., Mashino, Y., Nishikubo, N., Katayama, Y., and Omori, S.** (1997). Immunological Characterization of Transgenic Tobacco Plants With a Chimeric Gene For 4-Coumarate-Coa Ligase That Have Altered Lignin in Their Xylem Tissue. *Plant Science* 128, 109-118.
- Kaneko, M., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S.** (2003). Cinnamate : coenzyme A ligase from the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 185, 20-27.
- Keller, H., Hohlfeld, H., Wray, V., Hahlbrock, K., Scheel, D., and Strack, D.** (1996). Changes in the Accumulation of Soluble and Cell Wall-Bound Phenolics in Elicitor-Treated Cell Suspension Cultures and Fungus-Infected Leaves of *Solanum Tuberosum*. *Phytochemistry* 42, 389-396.
- Kenrick, P., and Crane Peter, R.** (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389, 33-39.
- Knobloch, K. H., and Hahlbrock, K.** (1977). 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. Partial purification, substrate specificity, and further properties. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 184, 237-48.
- Knobloch, K. H., and Hahlbrock, K.** (1975). Isoenzymes of p-coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max*. *European Journal of Biochemistry* 52, 311-20.
- Koopmann, E., and Hahlbrock, K.** (1997). Differentially Regulated NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductases in Parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14954-14959.
- Koopmann, E., Logemann, E., and Hahlbrock, K.** (1999). Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. *Plant Physiology* 119, 49-55.
- Korth, K. L., Blount, J. W., Chen, F., Rasmussen, S., Lamb, C., and Dixon, R. A.** (2001). Changes in phenylpropanoid metabolites associated with homology-dependent silencing of phenylalanine ammonia-lyase and its somatic reversion in tobacco. *Physiologia Plantarum* 111, 137-143.
- Krysan, P. J., Young, J. C., and Sussman, M. R.** (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 2283-2290.
- Kumar, A., and Ellis, B. E.** (2003). 4-Coumarate:CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression. *Plant Molecular Biology* 51, 327-340.
- Lawton E.** (1995). *Mol Plant Microbe Interact* 8(6):863-70
- Laibach, F.** (1907). *Bot. Centbl. Beihefte I*, 22: 191-210.
- Laibach, F.** (1943). *Bot. Archiv* 44, 439-455.
- Landry, L. G., Chapple, C. C. S., and Last, R. L.** (1995). *Arabidopsis* Mutants Lacking Phenolic Sunscreens Exhibit Enhanced Ultraviolet-B Injury and Oxidative Damage. *Plant Physiology* 109, 1159-1166.

- Lee, D., and Douglas, C. J.** (1996). Two Divergent Members of a Tobacco 4-Coumarate-Coenzyme A Ligase (4CL) Gene Family - cDNA Structure, Gene Inheritance and Expression, and Properties of Recombinant Proteins. *Plant Physiology* 112, 193-205.
- Lee, D., Ellard, M., Wanner, L. A., Davis, K. R., and Douglas, C. J.** (1995). The *Arabidopsis* Thaliana 4-Coumarate-CoA Ligase (4cl) Gene - Stress and Developmentally Regulated Expression and Nucleotide Sequence of Its Cdna. *Plant Molecular Biology* 28, 871-884.
- Lee, D., Meyer, K., Chapple, C., and Douglas, C. J.** (1997). Antisense Suppression of 4-Coumarate-Coenzyme A Ligase Activity in *Arabidopsis* Leads to Altered Lignin Subunit Composition. *Plant Cell* 9, 1985-1998.
- Lindermayr, C., Mollers, B., Fliegmann, J., Uhlmann, A., Lottspeich, F., Meimberg, H., and Ebel, J.** (2002). Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family - Primary structures, catalytic properties, and differential expression. *European Journal of Biochemistry* 269, 1304-1315.
- Logemann, E., Parniske, M., and Hahlbrock, K.** (1995). Modes of Expression and Common Structural Features of the Complete Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family in Parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5905-5909.
- Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W. G., Somssich, I. E., and Hahlbrock, K.** (2000). UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1903-1907.
- Logemann, E., Wu, S. C., Schroder, J., Schmelzer, E., Somssich, I. E., and Hahlbrock, K.** (1995). Gene Activation By Uv Light, Fungal Elicitor or Fungal Infection in *Petroselinum Crispum* Is Correlated With Repression of Cell Cycle-Related Genes. *Plant Journal* 8, 865-876.
- Mayer, M. J., Narbad, A., Parr, A. J., Parker, M. L., Walton, N. J., Mellon, F. A., and Michael, A. J.** (2001). Rerouting the plant phenylpropanoid pathway by expression of a novel bacterial enoyl-CoA hydratase/lyase enzyme function. *Plant Cell* 13, 1669-1682.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A., and Henikoff, S.** (2000). Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology* 123, 439-442.
- McClintock, B.** (1951) Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 16, 13-47.
- Meyer, K., Cusumano, J. C., Somerville, C., and Chapple, C. C. S.** (1996). Ferulate-5-Hydroxylase From *Arabidopsis* Thaliana Defines a New Family of Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6869-6874.
- Milkowski, C., Baumert, A., and Strack, D.** (2000). Identification of four *Arabidopsis* genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. *FEBS Letters* 486, 183-184.
- Mitra, A., Mayer, M. J., Mellon, F. A., Michael, A. J., Narbard, A., Parr, A. J., Waldron, K. W., and Walton, N. J.** (2002). 4-Hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase, an enzyme of phenylpropanoid cleavage from *Pseudomonas* causes formation of C-6-C-1 acid and alcohol glucose conjugates when expressed in hairy roots of *Datura stramonium* L. *Planta* 215, 79-89.

- Mizutani, M., Ohta, D., and Sato, R.** (1997). Isolation of a cDNA and a Genomic Clone Encoding Cinnamate 4-Hydroxylase From *Arabidopsis* and Its Expression Manner in Planta. *Plant Physiology* 113, 755-763.
- Nair, R.** (2000). Identification of a CYP84 family of cytochrome P450-dependent monooxygenase genes in *Brassica napus* and perturbation of their expression for engineering sinapine reduction in the seeds. *Plant Physiology* 123, 1623-1634.
- Neustaedter, D. A., Lee, S. P., and Douglas, C. J.** (1999). A novel parsley 4CL1 cis-element is required for developmentally regulated expression and protein-DNA complex formation. *Plant Journal* 18, 77-88.
- Parker, M. A.** (1992). Constraints on the evolution of resistance to pests and pathogens. Ayres, P. G.: Ed. *Environmental Plant Biology Series*, 181-197.
- Pennisi, E.** (2001). Genome duplications: The stuff of evolution? *Science* 294, 2458-2460.
- Pincon, G., Chabannes, M., Lapierre, C., Pollet, B., Ruel, K., Joseleau, J. P., Boudet, A. M., and Legrand, M.** (2001). Simultaneous down-regulation of caffeic/5-hydroxy ferulic acid-O-methyltransferase I and cinnamoyl-coenzyme a reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene. Consequences for plant development and lignin synthesis. *Plant Physiology* 126, 145-155.
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., Oconnell, A., Schuch, W., Grimapettenati, J., and Boudet, A. M.** (1998). Down-Regulation of Cinnamoyl-Coa Reductase Induces Significant Changes of Lignin Profiles in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Journal* 13, 71-83.
- Ponath, Y., Vollberg, H., Hahlbrock, K., and Kombrink, E.** (2000). Two differentially regulated class II chitinases from parsley. *Biological Chemistry* 381, 667-678.
- Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J. M., Kim, H., Lu, F. C., Hatfield, R. D., Ralph, S., Chapple, C., Franke, R., Hemm, M. R., Van Doorselaere, J., Sederoff, R. R., O'Malley, D. M., Scott, J. T., MacKay, J. J., Yahiaoui, N., Boudet, A. M., Pean, M., Pilate, G., Jouanin, L., and Boerjan, W.** (2001). Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* 57, 993-1003.
- Ratcliff F. G., MacFarlane S. A., and Baulcombe D. C.** (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207-1215.
- Reinold, S., and Hahlbrock, K.** (1997). In Situ Localization of Phenylpropanoid Biosynthetic Mrnas and Proteins in Parsley (*Petroselinum Crispum*). *Botanica Acta* 110, 431-443.
- Rice-Evans, C. A., Miller, J., and Paganga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152-159.
- Riley, R. G., and Kolattukudy, P. E.** (1975). Biosynthesis of alkane-2, 3-diols: chemical synthesis of 3-hydroxy-[3-14C]octadecane-2-one and its reduction to [3-14C]octadecane-2, 3-diol in the uropygial glands of ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*). *Archives of Biochemistry & Biophysics* 171, 276-81.
- Rozema, J., Vandestaaij, J., Bjorn, L. O., and Caldwell, M.** (1997). UV-B as an environmental factor in plant life - stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution* 12, 22-28.
- Ruegger, M., and Chapple, C.** (2001). Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. *Genetics* 159, 1741-1749.

- Ruegger, M., Meyer, K., Cusumano, J. C., and Chapple, C.** (1999). Regulation of ferulate-5-hydroxylase expression in *Arabidopsis* in the context of sinapate ester biosynthesis. *Plant Physiology* 119, 101-110.
- Sagasser, M., Lu, G. H., Hahlbrock, K., and Weisshaar, B.** (2002). A-thaliana TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes & Development* 16, 138-149.
- Saslowsky, D. E., Dana, C. D., and Winkel-Shirley, B.** (2000). An allelic series for the chalcone synthase locus in *Arabidopsis*. *Gene* 255, 127-138.
- Schalk, M., Cabellohurtado, F., Pierrel, M. A., Atanossova, R., Saindrenan, P., and Werckreichhart, D.** (1998). Piperonylic Acid, a Selective, Mechanism-Based Inactivator of the Trans-Cinnamate 4-Hydroxylase - a New Tool to Control the Flux of Metabolites in the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology* 118, 209-218.
- Sewalt Vincent, J. H., Ni, W., Jung Hans, G., and Dixon Richard, A.** (1997). Lignin impact on fiber degradation: increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems reduced in lignin content. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 45, 1977-1983.
- Sewalt, V. J. H., Ni, W. T., Blount, J. W., Jung, H. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C., and Dixon, R. A.** (1997). Reduced Lignin Content and Altered Lignin Composition in Transgenic Tobacco Down-Regulated in Expression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase or Cinnamate 4-Hydroxylase. *Plant Physiology* 115, 41-50.
- Sheahan, J.J., Rechnitz, G.A.** (1993). Differential visualization of transparent testa mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Analytical Chemistry* 65(7) 961-963.
- Shirley, B. W.** (1996). Flavonoid biosynthesis - new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science* 1, 377-382.
- Shirley, B. W., Hanley, S., and Goodman, H. M.** (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *Plant Cell* 4, 333-47.
- Shirley, B. W., Kubasek, W. L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F. M., and Goodman, H. M.** (1995). Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant Journal* 8, 659-71.
- Solecka, D., Boudet, A. M., and Kacperska, A.** (1999). Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiology & Biochemistry* 37, 491-496.
- Somerville, C., and Koornneef, M.** (2002). Timeline - A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics* 3, 883-889.
- Strauch, E., Wohlleben, W., and Puhler, A.** (1988). Cloning of a phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene* 63, 65-74.
- Stuible, H. P., Buttner, D., Ehltig, J., Hahlbrock, K., and Kombrink, E.** (2000). Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylyate-forming enzymes. *FEBS Letters* 467, 117-122.
- Stuible, H. P., and Kombrink, E.** (2001). Identification of the substrate specificity-conferring amino acid residues of 4-coumarate:coenzyme A ligase allows the rational design of mutant enzymes with new catalytic properties. *Journal of Biological Chemistry* 276, 26893-26897.
- Swain, T.** (1986). The evolution of flavonoids. *Progress in Clinical & Biological Research* 213, 1-14.

- Thompson John, N., and Burdon Jeremy, J.** (1992). Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature* 360, 121-125.
- Thorneycroft, D., Sherson, S. M., and Smith, S. M.** (2001). Using gene knockouts to investigate plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 52, 1593-1601.
- Tissier, A. F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M. A., Murphy, G., and Jones, J. D. G.** (1999). Multiple independent defective Suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: A tool for functional genomics. *Plant Cell* 11, 1841-1852.
- Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schroder, J., and Schroder, G.** (1994). Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 38, 610-8.
- Vincent J. F. V.** (1994). Biomechanics in botany: A general introduction. *Biomimetics* 2, 77-85.
- Waterhouse P.** (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 10;95(23):13959-64.
- Weigel, D., Ahn, J. H., Blazquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J., Neff, M. M., Nguyen, J. T., Sato, S., Wang, Z. Y., Xia, Y. J., Dixon, R. A., Harrison, M. J., Lamb, C. J., Yanofsky, M. F., and Chory, J.** (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122, 1003-1013.
- White, J., Chang, S. Y., and Bibb, M. J.** (1990). A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygrosopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 18.
- Winkel-Shirley, B.** (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* 107, 142-149.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126, 485-493.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology* 127, 1399-1404.
- Wisman, E., Hartmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H., and Weisshaar, B.** (1998). Knock-Out Mutants From an En-1 Mutagenized *Arabidopsis Thaliana* Population Generate Phenylpropanoid Biosynthesis Phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 12432-12437.
- Wisman E., Cardon G.H., Franz P., and Saedler H.** (1998). The behaviour of the autonomous maize transposable element En/Spm in *A. thaliana thaliana* allows efficient mutagenesis.
- Yazaki, K., Ogawa, A., and Tabata, M.** (1995). Isolation and Characterization of Two Cdnas Encoding 4-Coumarate:CoA Ligase in *Lithospermum* Cell Cultures. *Plant & Cell Physiology* 36, 1319-1329.
- Yuan, Q. P., Quackenbush, J., Sultana, R., Perteau, M., Salzberg, S. L., and Buell, C. R.** (2001). Rice bioinformatics. Analysis of rice sequence data and leveraging the data to other plant species. *Plant Physiology* 125, 1166-1174.
- Zhang, X. H., and Chiang, V. L.** (1997). Molecular Cloning of 4-Coumarate-Coenzyme A Ligase in Loblolly Pine and the Roles of This Enzyme in the Biosynthesis of Lignin in Compression Wood. *Plant Physiology* 113, 65-74.

8 Anhang

Tabelle 4: Herkunft der für die phylogenetischen Analysen verwendeten 4CLs.

Name und Genebank identifier	Organismus	Länge der Aminosäuresequenz
AeBZL CAD21640	<i>Azoearcus evansii</i>	533
At4CL like CAB81058	<i>Arabidopsis thaliana</i>	544
At4CL 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	561
At4CL 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	556
At4CL 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	561
At4CL4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	571
Ca4CL AF212317_1	<i>Capsicum annum</i>	542
Gm4CL2 AAC97600	<i>Glycine max</i>	547
Gm4CL3 AAC97599	<i>Glycine max</i>	570
Gm4CL4 CAC36095	<i>Glycine max</i>	562
Gm4CL1 AAL98709	<i>Glycine max</i>	546
HhPCL bakteriell ECTHA	<i>Halorhodospira halophila</i>	391
Le4CL BAA08365	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	636
Le4CL BAA08366	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	585
Lp4CL1 aaf37732 AF052221_1	<i>Lolium perenne</i>	570
Lp4CL2 aaf37733 AF052222_1	<i>Lolium perenne</i>	556
Lp4CL3 aaf37734 AF052223_1	<i>Lolium perenne</i>	557
Nt4CL T02074	<i>Nicotiana tabacum</i>	542
Nt4CL1 O24145	<i>Nicotiana tabacum</i>	547
Nt4CL2 O24146	<i>Nicotiana tabacum</i>	542
Os4CL1 P17814	<i>Oryza sativa</i>	563
Os4CL2 L43362 AAA69580	<i>Oryza sativa</i>	569
Pb4CL1 T07909	<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>	557
Pb4CL2 T07908	<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>	548
Pb4CL3 AF283552_1	<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>	540
Pb4CL4 AAK58909	<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>	579
Pc4CL2 CAA31697	<i>Petroselinum crispum</i>	544
PtPi4CL1 P41636	<i>Pinus taeda</i>	537
PtPi4CL2 T09755	<i>Pinus taeda</i>	537
PtPo4CL AAL56850	<i>Populus tomentosa</i>	536
PtQa4CL T08074	<i>Populus tremuloides</i>	535
PtQa4CL2 T08075	<i>Populus tremuloides</i>	570
Rc4CL bakteriell PCL	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	417
Ri4CL1 AAF91310 AF239687_1	<i>Rubus idaeus</i>	543
Ri4CL2 AAF91309 AF239686_1	<i>Rubus idaeus</i>	544
Ri4CL3 AAF91308 AF239685_1	<i>Rubus idaeus</i>	591
RpBZL bakteriell AAK39104	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	523
Rs4CL bakteriell PCL_RHOSH	<i>Rhodobacter shpaeroides</i>	411
Sc4CL bakteriell CAB95894	<i>Streptomyces coelicolor</i>	522
St4CL1 SOLTU	<i>Solanum tuberosum</i>	545
Vp4CL O24540	<i>Vanillia planifolia</i>	553

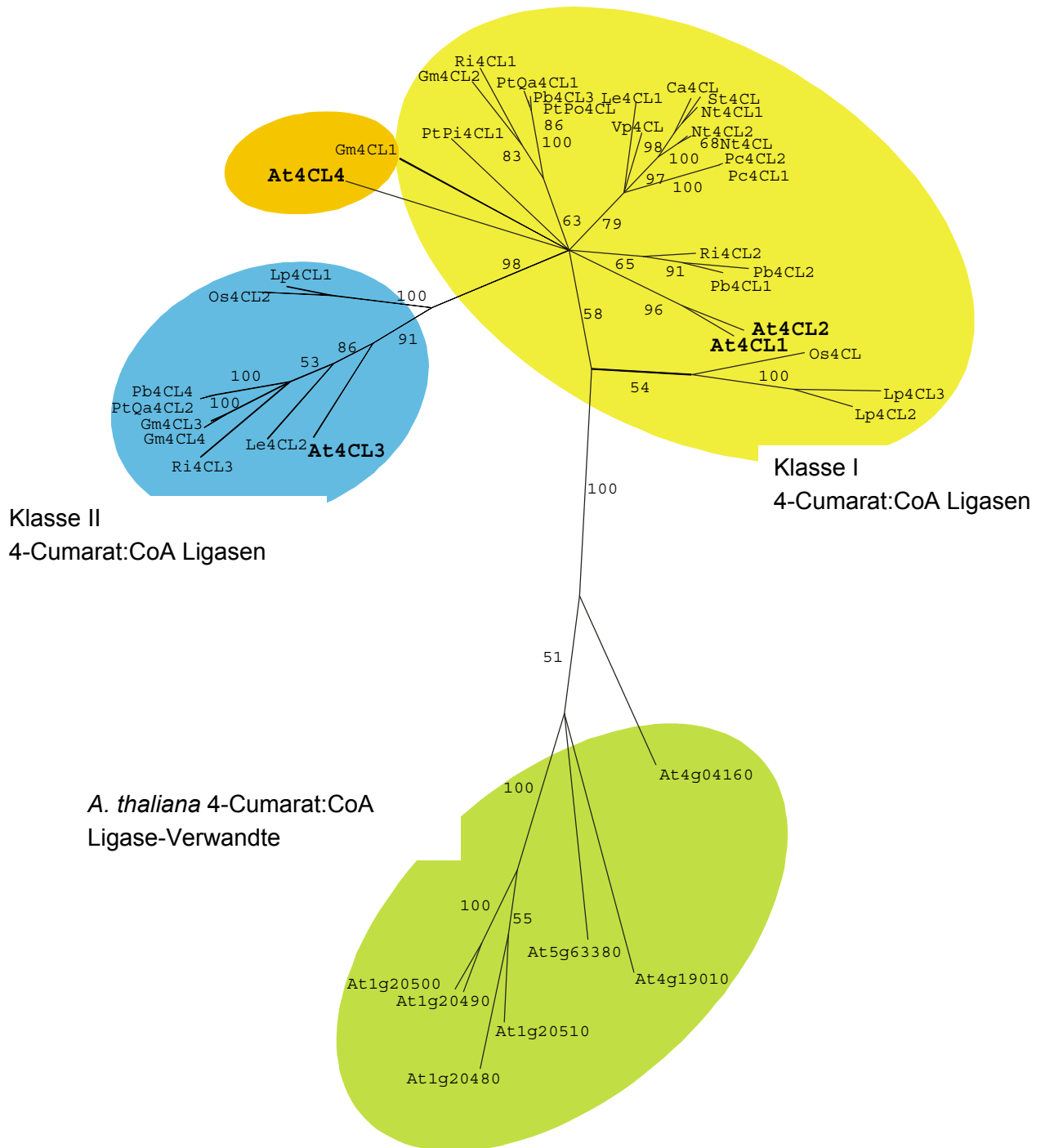


Abbildung 44: Ungewurzelte Baumdarstellung der phylogenetischen Analyse annotierter 4CLs und den nächsten 4CL-ähnlichen Verwandten in *A. thaliana*.

Eine Bootstrap-Analyse der heuristischen Suche (maximum parsimony, TBR, 500 Durchläufe) nach dem optimalen Baum wurde durchgeführt. Signifikante Bootstrap-Werte sind an den Ästen angegeben, Distanzwerte entsprechen der relativen Länge der Äste. Vertreter der Klasse I 4CLs sind gelb bzw. orange für die mutmaßlichen Mitglieder, Klasse II 4CLs sind blau hinterlegt. Die Gruppe der zu den 4CLs nächsten Verwandten ist grün unterlegt.

Tabelle 5: Mutmaßliche cis-aktive Elemente, identifiziert mit Hilfe der PLACE Datenbank.

Die Bezeichnung der Elemente wurde von der Datenbank übernommen. Die Konsensussequenzen, angegeben in der zweiten Spalte, wurden dort, wo sie in den Promotoren gefunden wurden, in der Spalte der Gene At4CL1 bis At4CL4 mit ihrer relativen Position zum ATG aufgeführt. Soweit angegeben, steht in Klammern der Wert, der statistisch die Häufigkeit des jeweiligen Elements in der Länge des Promotors repräsentiert.

Gen/Element	Sequenz	4CL1 1004 bp	4CL2 1553 bp	4CL3 633 bp	4CL4 1598 bp
ACEAtCHS	GACACGTAGA/ TACGTGTC/ ACGTGKC				-252
ABREMOTIFAOSOSE/ ACGTABREMOTIFA2	TACGTA				-224
ACGT A Box	AACGTT		-65 (0.76)		
ACGT Box	TGTCTC		-768 -221 (0.76)		
ATHB2ATCONSE	CAATSATTG		-187		
CCA1ATLHCB1	AAMAATCT		-50	-604	
D3GMAUX28	TATTTGCTTAA			-587	
ELRECOREPCR1	TTGACC				-693 -515
GT1 Consensus	GRWAAW	-47 -164 -244 -302 -329 -336 -358 -508 -570 -594 -620 -648 -840 -979 (3.9)	-1479 -1241 -976 -891 -884 -563 -285 -254 -31 -1007 -867 -553 -1099 -820 (6.1)	-605 -311 -546	-1266 -1113 -807 -191 -174 -78 -1375 -1259 -958 -910 -875 -672 -1245
GT1MOTIFPSRBCS	KWGTGRWAAWRW	-304 (0.02)			
HBOXCONSENSUSPVCHS	CCTACCNNNNNNNCT			-276	
HDZIP2ATATHB2	TAATMATTAA				-124 -374
I-Box	GATAAG	-690 (0.5)	-1338 (0.8)		
INRNTPSADB	YTCANTYY		-546 -864 -41 -1136 -1015	-370 -196 -104	-1112

			-341			
			-806			
			(1.5)			
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	-113	-499			
		(0.5)	(0.8)			
MARARS	WTTTATRRTTWW					-513
Mara-Box	AATAAAAYAAA	-399				
Mart-Box	TTWTWTTWTT	-927				-40
		-464				
		-427				
Myb2At	TAACTG	-343				
		(0.5)				
Mybcore	CNGTTR	-883	-1316	-379		-1428
		-343	-740	-264		-513
		(3.9)	-622			-83
			-764			
			-682			
			-604			
			-625			
			-1025			
			(6.1)			
MybGAHV	TAACAAA					-341
Mybplant	MACCWAMC	-58	-233	-300		-1029
		-159	-124			
		(0.25)	(0.4)			
MYBPZM	CCWACC	-157	-122	-328		-735
		(1.0)	(1.5)	-246		
PALBoxAPc	CCGTCC					-1252
PALBoxPPc	YTYMMCMAMCMMC	-163				
VSF1PVGRP18	GCTCCGTTG					-1319
WBOXPcWRKY1	TTTGACT	-965				-1133
WBOXAtNPR1	TTGAC	-879	-1168			-270
		(2.0)	(3.0)			-515
						-421

Tabelle 6: Häufigkeit und Verteilung von W-Boxen in Promotoren von Phenylpropanstoff-Genen. (auf der folgenden Seite dargestellt)

Gene verschiedenster Organismen wurden durch einen BLAST Suchlauf in den Datenbanken (MIPS, NCBI oder ENTREZ) ermittelt. Anschließend wurde nach

Verfügbarkeit die Promotorsequenz stromaufwärts des annotierten ATG-Startcodons extrahiert und mit Hilfe der PLACE Datenbank auf das W-Box Motiv TTGACC in Richtung des kodierenden Stranges und der Gegenrichtung untersucht. Es wurden nur Sequenzen verglichen, deren Promotorsequenz eine Länge von mindestens 950 bp aufwies. Es sind die Positionen von W-Boxen angegeben, die sich anschließend in den bis zu 1000 bp vor den ATG nachweisen ließen.

Organismus/ Gen	Genebank identifier	Position mutmaßlicher W-Box <ttgacc>
<i>At</i> C4H	1773286	--
<i>At</i> PAL	6434245 (BAC)	893
<i>At</i> PAL1	20197941 (BAC)	--
<i>At</i> PAL2	497420	925
<i>At</i> PAL3	507947	--
<i>At</i> 4CL1	5702183	--
<i>At</i> 4CL2	5702185	--
<i>At</i> 4CL3	5702189	--
<i>At</i> 4CL4	5702185*(siehe Anmerkung)	515 693
<i>At</i> CHS	166669	--
<i>Os</i> (jap) hypoth. C4H	21104777 (BAC)	--
prob. <i>Os</i> 4CL3	bankit 511187	--
prob. <i>Os</i> 4CL4	bankit 511335	--
prob. <i>Os</i> 4CL5	bankit 511375	--
<i>Nt</i> PALB	2564056	--
<i>Nt</i> PALA	2564054	962
<i>Nt</i> PAL1	170349	--
<i>Me</i> PAL2	14326458	--
<i>St</i> PAL1	21496	895
<i>Le</i> PAL	310937	560 925
<i>Dc</i> PAL	2618589	--
<i>Pc</i> 4CL1	20430	934
<i>Pc</i> 4CL2	20434	--
<i>Vv</i> PAL2	3288719	226 917 985
<i>In</i> PAL	12240239	--
<i>Bp</i> PAL	8249040	--
<i>Ps</i> PAL1	217981	480 800
<i>Ps</i> PAL2	217983	543 566
<i>Pk</i> PAL2BA	1109640	--
<i>Pk</i> PALA	485808	280
<i>Pt</i> 4CL	15636676	873

*Promotor von *At*4CL4 liegt unannotiert mit auf dem 4CL2 Bereich.

At Arabidopsis thaliana, *Os Oryza sativa*, *Nt Nicotiana tobaccum*, *Me Manihot esculenta*, *St Solanum tuberosum*, *Le Lycopersicon esculentum*, *Dc Daucus carota*, *Pc Petroselinum crispum*, *Vv Vitis vinifera*, *In Ipomoea nil*, *BP Betula pendula*, *Ps Pisum sativum*, *Pk Populus kitakamensis*, *Pt Populus tomentosa*;

Sequenzvergleich von 4CLs verschiedenster Organismen auf Aminosäureebene

Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms pileup erstellt (Parameter: gap creation penalty Standardwert 5, gap extension penalty Standardwert 1; Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.) und liegt den phylogenetischen Analysen zugrunde. Der Ursprung und die Quellen der Sequenzrohdaten wird beschrieben im Kapitel 2.7.12 (Seite 43).

At *Arabidopsis thaliana*, Lp *Lolium perenne*, Pb *Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* x *Populus deltoides*, Ri *Rubus idaeus*, St *Solanum tuberosum*, Os *Oryza sativa*, Nt *Nicotiana tobaccum*, St *Solanum tuberosum*, Le *Lithospermum erythrorhizon*, Pc *Petroselinum crispum*, Ps *Pisum sativum*, PtPi *Pinus taeda*, PtQa *Populus tremuloides*.

Markiert sind die konservierten Peptidmotive Box I und II sowie die einzige Position, in der die Soja Gm4CL1 und die A. thaliana At4CL4 eine vom allgemeinen Konsensus abweichende Deletion tragen.

PtPi4CL1	-----MAN	GIKKVEHLR	SKLPDIEISD	HPLPHSYCFE	RVA...EFAD
Gm4CL1	-----M	APSPQEIIFR	SPLPDIPIPT	HPLPHSYCFQ	NLS...QFHD
Lp4CL1	IAAAAAA	VEA APEATTIFR	SRLPDIPIPT	HMLPHDYCFA	TAA...SAP.
Os4CL1	V...AAAVDE	APPEAVTVFR	SKLPDIDIPS	HPLPHDYCFA	RAA...BLPD
Pb4CL4	NAPSSHETDHIFR	SKLPDITISN	HPLPHAYCFE	NLS...DFD.
PtQa4CL2	NAPSSHETDHIFR	SKLPDITISN	DPLPHAYCFE	NLS...DFS.
Gm4CL4	VCDCDPQTSVFK	SKLPDIPISN	HPLPHAYCFQ	KLS...Q.CD
Gm4CL4	V...SDPQTSVFK	SKLPDIPISN	HPLPHSYCFQ	NLS...QFAH
Ri4CL3	QPPTT.TTHHVFK	SKLDPINISN	HPLPHTYCFE	NIS...DFSE
Le4CL2	SSISGDNNNSN	E...TIIFR	SKLPDIPISN	NLPLH.YCFQ	NAS...EYPN
At4CL3	SVVSDVLP	SPP.TPRIFR	SKLPDIDIPN	HPLPHTYCFE	KLS...VSD
At4CL4	TKKIDQEDEE	EEPSHDFIFR	SKLPDIFIPN	HPLPLTYVYFQ	RFSGDGDS
101					
Lp4CL2	RACLIDGATG	.AALTYGVDA	LSRRCAGLR	R.LGVGKGD	VVMALLRNCP
Lp4CL3	RPCIDGQTG	.ASTYTBVDS	LTRRAAAGLR	R.MGVGKGD	VVMALLRNCP
Os4CL1	RPCLIDGTGG	.VLTADVDR	LSRRLAAALR	RAPLGLRRGG	VVMSLLRNSP
At4CL1	KPCLINP.TG	HVYTYSDVHV	ISRQIAANFH	K.LGVNQND	VVMALLPNCP
At4CL2	KPCLING.PG	EVYTYADVHV	TSRKLAAAGLH	N.LGVKQHD	VVMILLPNSP
Pb4CL1	NPCLINGPTG	EIHTYAEV.L	TSRKVASGLN	K.LGKQGD	VILLLLQNSP
Pb4CL2	NPCLINGPTG	DIYTYADV.L	TSRKVASGLY	K.LGIQQGD	VLLLLQNSP
Ri4CL2	RPCLINGNTG	ETFTYAEV.L	TSRRAVAGLD	K.LGIQQND	VVMALLQNSP
Pc4CL1	KSCLINGATG	ETFTYS...L	LSRKVASGLN	K.LGIQQGD	TIMLLLPNSP
Pc4CL2	KSCLINGATG	ETFTYSQV.L	LSRKVASGLN	K.LGIQQGD	TIMLLLPNSP
Nt4CL	RPCLINGANK	QIYTYADVE.	SSRKAAGLH	K.QGIQQKD	TIMLLLPNSP
Nt4CL2	RPCLINGANK	QIYTYADVE.	NSRKAAGLH	K.QGIQPKD	TIMLLLPNSP
Nt4CL1	RPCLINGAND	QIYTAEVEL.	TCRKAAGLH	K.LGIQQKD	TIMLLLPNSP
St4CL	RPCLIDGAND	RIYTYAEV.L	TSRKAAGLH	K.LGIQQKD	TIMLLPNCP
Ca4CL	RPCLIDGAND	QIYSYAEVE.	TSRKAAGLH	K.LGVQKGD	TIMLLPNSP
Vp4CL	RPCLINGATD	EIYTYADVEL	ISRRVSGLS	K.LGIKQGD	TIMLLPNSP
Le4CL1	RPCLINGSND	RVYTYAE.EI	TSRKAAGLH	K.HGIKQTE	TIMLLPNCP
Pb4CL3	KPCLINGANG	DVYTYADV.L	TARRVASGLN	K.LGIQQGD	VIMLFLPSSP
PtPo4CL	KPCLINGANG	DVYTCADVEL	TARRVASGLN	K.LGIQQGD	VIMLFLPSSP
PtQa4CL1	KPCLINGANG	DVYTYADVEL	TA.RVASGLN	K.LGIQQGD	VIMLFLPSSP
Ri4CL1	KPCLINGTTG	DIHTYAKFK.	TARKVASGLN	K.LGIEKGD	VFMFLLPNTS
Gm4CL2	RPCLINAPTG	DVYSYHEVD.	TARKVARGLK	K.EGVEQGD	VIMLLPNCP
PtPi4CL1	RPCLIDGATD	RTYCFSEVEI	.SRKVAAGLA	K.LGLQQQGD	VVMILLPNCI
Gm4CL1	RPCLIDGDTG	ETLTYADVDL	.ARRIASGLH	K.LIGIRQGD	VIMLVLRNCP
Lp4CL1	APCLITAAATG	KTYTFAETHL	LCKRAAALH	G.LGVRHGD	RIMLLQNSV
Os4CL2	APC.IAATG	RTYTFABTRL	LCKRAAALH	R.LGVGHGD	RVMVLLQNSV
Pb4CL4	RPCLISGSTG	KTYSFAETHL	ISRKVAAGLS	N.LGIKGD	VIMTLLQNSP
PtQa4CL2	RPCLISGSTG	KTYSFAETHL	ISRKVAAGLS	N.LGIKGD	VIMTLLQNSP
Gm4CL3	RPCLIVGPA	KTYTSEBTHL	ISRKVAAGLS	N.LGIRKGD	VIMTLLQNSA
Gm4CL4	RPCL.VGPAS	KTYTADTHL	ISSKIAAGLS	N.LGLIKGD	VIMLQNSA
Ri4CL1	RPCLIIIGSTG	KSYTFSBTRL	LSQKTGVGLS	K.LGHKGD	VIMLLQNSA
Le4CL2	RTCIDSKTG	KQYTFSETDS	ICRVAAGLS	N.LGIQKGD	VIMLLQNSA
At4CL3	KPCLIVGSTG	KSYTYGETHL	ICRVAAGLY	K.LGIRKGD	VIMTLLQNSA
At4CL4	TTCIDGATG	RILTYADVQT	NMRRIAAGIH	R.LGIRHGD	VVMLLPNSP
151					
Lp4CL2	EFAPVFLGAA	RLGAATTAN	PFYTPHEIHR	QATAAGARVI	VTEACAVEKV
Lp4CL3	EFAPVFLGAA	RLGAATTAN	PFYTPHEIHR	QABAAGAKLI	VTEACAVEKV
Os4CL1	EFVLSFFAAS	RVGAAVTTAN	PMSTPHEIHS	QLAAAGATVV	ITPESMADKL
At4CL1	EFVLSFLAAS	FRGATATAAN	PFPTPAEIAK	QAKASNTKLI	ITHEARYVDKI
At4CL2	EVVLTFLAAS	FIGAITTSAN	PFPTPAEISK	QAKASAARKLI	VTQSRVYDKI
Pb4CL1	EFVFAFLGAS	IIGAISTAN	PFYTPAEVAK	QATASAKALI	ITTHAAAEKV
Pb4CL2	EFVFAFLGAS	FIGAISTAN	PFYTPAEIAK	QATASKAKLI	ITVAAYAEKV
Ri4CL2	EFAPAFPLGAS	YIGAMSTAN	PFYTPAEVAK	QAKASNAKLI	ITQASAYDKV
Pc4CL1	EYFFAPFLGAS	YRGAISTMAN	PFPTSAEVIK	QLKASQAKLI	ITQACYVDKV
Pc4CL2	EYFFAPFLGAS	YRGAISTMAN	PFPTSAEVIK	QLKASQAKLI	ITQACYVDKV
Nt4CL	EFVFAFIGAS	YLGAISTMAN	PLFPTAEVVK	QKASGAKII	VTQACHVNVK
Nt4CL2	EFVFAFIGAS	YLGAISTMAN	PLFPTAEVVK	QKASGAKII	VTQACHVNVK
Nt4CL1	EFVFAFMGAS	YLGAISTMAN	PLFPTAEVVK	QKASGAKII	ITQCSFVGVK
St4CL	EFVFAFIGAS	YLGAISTMAN	PLFPTAEVVK	QKASGAKII	ITQCFAGVK
Ca4CL	EFVFAFMGAS	YLGAISTMAN	PLFPTAEVVK	QKASGAKII	ITLACVIGVK
Vp4CL	EFVFAFLGAS	FIGSISTMAN	PFYTPAEVVK	QKASNAKLI	ITQCYVDKV
Le4CL1	EFVFAFLGAS	YIGAVSTAN	PFPTSEIHK	QAKSKTKLI	ITVSTVTKLI
Pb4CL3	EFVFAFLGAS	HRGAVTTAN	PFPTPAELAK	HAKAPRKLKLI	ITQACYVDKV
PtPo4CL	EFVFAFLGAS	HRGAVTTAN	PFPTPAELAK	HAKASRAKLI	ITQACYVEKV
PtQa4CL1	EFVFAFLGAS	HRGAVTTAN	PFPTPAELAK	HAKASRAKLI	ITQACYVEKV
Ri4CL1	EFVFAFLGAS	FCGAMTTAN	PFYTPAEIAK	QAKASAKKLI	ITFACYVDKV
Gm4CL2	EFVFSFLGAS	HRGAMTTAN	PFPTPAEIAK	QAHASNAKLI	ITQASAYDKV
PtPi4CL1	EFAPVFMGAS	VRGAVTTAN	PFYTPAEIAK	QAKAAGARVI	ITLAASYEKL
Gm4CL1	QFALAPLFGAT	HRGAVTTAN	PFYTPAEIAK	QATATKTRLV	ITQASAYEKI
Lp4CL1	EFALAFFGAS	MLGAVTTAN	PFCTPQEIHK	QLVAGSKLV	ITQASAYDKL
Os4CL2	EFVAFVFAAS	FLGAVTTAN	PFCTPQEIHK	QFKGSGVKLI	LTQSYVDKLI
Pb4CL4	EFVFSFMGAS	MIGAVTTAN	PFYTPQEIHK	QFSASRAKLI	ITQSQVNVKL
PtQa4CL2	EFVFSFIGAS	MIGAVTTAN	PFYTPQEIHK	QFSASRAKLI	ITQSQVNVKL
Gm4CL3	EFVFSFLAAS	MIGAVTTAN	PFYTPAEIHK	QFTVSKTKLI	ITQAMYVDKLI
Gm4CL4	DFVFSFLAAS	MIGAVTTAN	PFYTPAEIHK	QFTVSKTKLI	ITQAMYVDKLI
Ri4CL3	EFVFAFMGAS	MIGAVTTAN	PFYTPAEIHK	QFTVSKTKLI	ITQSQYVDKLI
Le4CL2	EFVFTFMGAS	IIGAVTTAN	PFYTPAEIHK	QVNSVNTKLI	ITQSNYVDKLI
At4CL3	EFVFSFMGAS	MIGAVTTAN	PFYTPQEIHK	QLKSSGAKLI	ITHSQYVDKLI
At4CL4	EFALSFLAVA	YLGAVTTAN	PFYTPQEIHK	QAKASAARKMI	ITKCKLVDKLI
201					
Lp4CL2	RAPFAA....ERGIP	VVSVDE....	GV....DGGC	LPFAETLLGE
Lp4CL3	LeFAA....GRGVP	VVTVD....	GR....RDGC	VDFABELLGE
Os4CL1	PSHS.....G.ALT	VVLIDE....	R....RDGC	LHFWDLLMGE
At4CL1	KP.....L.QNDDGVV	IVCIDDNEV	PI....PEGC	LRP.TELTQS
At4CL2	KN.....L.QN.DGVV	IVTDD...SD	AI....PENC	LRP.SELTQS
Pb4CL1	QE.....FVKENVHVK	IVTVD.SP...PENY	LHF.SELTNS
Pb4CL2	QQ.....FAQENDHVK	IMTID.SL...TENC	LHF.SELTSS
Ri4CL2	KD.....FAKLDN.VK	VMCVDETS...SEBV	LHF.SELMSA
Pc4CL1	KD.....YAAEKN.IQ	IICIDDA...PQDC	LHF.SKLMEA
Pc4CL2	KD.....YAAEKN.IQ	IICIDDA...PQDC	LHF.SKLMEA
Nt4CL	KD.....YALENN.VK	IICIDSA...PEGC	LHF.SVLTQA
Nt4CL2	KD.....YAFEND.VK	IICIDSA...PEGC	LHF.SVLTQA
Nt4CL1	KD.....YASEND.VK	VICIDSA...PEGC	LHF.SELTQS
St4CL	KD.....YAIEND.LK	VICVDSV...PEGC	VHF.SELIQS
250					
Lp4CL2	ADA...PPABLVFR	SKLPDIEIPT	HPLPHSYCFQ	RLP...ELSA
Lp4CL3	EESVVAVAPAETVFR	SKLPDIEINN	EQTLQSYCFE	KMA...EVAS
Os4CL1	QQQPESAAPA	TEASPEIIFR	SKLQDIAITN	TLPLHRYCFE	RLP...EVAA
At4CL1	VS.QVMEKQS	NNNSDVIIFR	SKLPDIYIPN	HLSLHDIYIFQ	NIS...EFAT
At4CL2	VNDQNDKQCK	SN...DVIIFR	SRLPDIYIPN	HPLPHDYIFE	NIS...EFAA
Pb4CL1	-----MEAK	NDQAQEFIFR	SKLPDIHIPN	HPLPHTYCFE	NLS...RFKD
Pb4CL2	-----MEAN	KDQVQEFIFR	SKLPDIYIPN	HPLPHTYCFE	KLS...QPKD
Ri4CL2	-----MENK	HQDDHEFIIFR	SKLPDIYIPN	HPLPHTYCFE	NIS...QFHD
Pc4CL1	-----MGDC	VAPKEDLIIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHTYCFE	NIS...KVDG
Pc4CL2	-----MGDC	VAPKEDLIIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHTYCFE	NIS...KVDG
Nt4CL	----MEKDTK	...HGDIIIFR	SKLPDIYIPN	HPLPHSYCFE	NIS...EFSS
Nt4CL2	----MEKDTK	...QVDIIIFR	SKLPDIYIPN	HPLPHSYCFE	NIS...EFSS
Nt4CL1	---MPMETTTE	TKQSGDLIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHSYCFE	NIS...EFSS
St4CL	---MPMD..TE	TKQSGDLIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHSYCFE	NLS...EFNS
Ca4CL	---MPMENETRDLIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHSYCFE	NIS...EFNS
Vp4CL	---MAAAVAI	EQKEDLIIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYCFE	NIS...KFSS
Le4CL1	---MDTQTK	TDQK.DIIIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYCFE	NIS...QFSS
Pb4CL3	-----MDAI	MNSQBEFIIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYVLE	NLS...KYSS
PtPo4CL	-----MNPQ	BEFIIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYVLE	NLS...KHSS
PtQa4CL1	-----MNPQ	EFIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYVLE	NLS...KHSS
Ri4CL1	-----MAV	PTQPNIIVYR	SKLPDIHIPN	HPLPHSYIFQ	NKS...HLTS
Gm4CL2	-----MAD	DGSRRELIFR	SKLPDIYIPK	HMLPHSYCFE	NLR...ECGS
51					
Lp4CL2	ADA...PPABLVFR	SKLPDIEIPT	HPLPHSYCFQ	RLP...ELSA
Lp4CL3	EESVVAVAPAETVFR	SKLPDIEINN	EQTLQSYCFE	KMA...EVAS
Os4CL1	QQQPESAAPA	TEASPEIIFR	SKLQDIAITN	TLPLHRYCFE	RLP...EVAA
At4CL1	VS.QVMEKQS	NNNSDVIIFR	SKLPDIYIPN	HLSLHDIYIFQ	NIS...EFAT
At4CL2	VNDQNDKQCK	SN...DVIIFR	SRLPDIYIPN	HPLPHDYIFE	NIS...EFAA
Pb4CL1	-----MEAK	NDQAQEFIFR	SKLPDIHIPN	HPLPHTYCFE	NLS...RFKD
Pb4CL2	-----MEAN	KDQVQEFIFR	SKLPDIYIPN	HPLPHTYCFE	KLS...QPKD
Ri4CL2	-----MENK	HQDDHEFIIFR	SKLPDIYIPN	HPLPHTYCFE	NIS...QFHD
Pc4CL1	-----MGDC	VAPKEDLIIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHTYCFE	NIS...KVDG
Pc4CL2	-----MGDC	VAPKEDLIIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHTYCFE	NIS...KVDG
Nt4CL	----MEKDTK	...HGDIIIFR	SKLPDIYIPN	HPLPHSYCFE	NIS...EFSS
Nt4CL2	----MEKDTK	...QVDIIIFR	SKLPDIYIPN	HPLPHSYCFE	NIS...EFSS
Nt4CL1	---MPMETTTE	TKQSGDLIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHSYCFE	NIS...EFSS
St4CL	---MPMD..TE	TKQSGDLIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHSYCFE	NLS...EFNS
Ca4CL	---MPMENETRDLIFR	SKLPDIYIPK	HPLPHSYCFE	NIS...EFNS
Vp4CL	---MAAAVAI	EQKEDLIIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYCFE	NIS...KFSS
Le4CL1	---MDTQTK	TDQK.DIIIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYCFE	NIS...QFSS
Pb4CL3	-----MDAI	MNSQBEFIIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYVLE	NLS...KYSS
PtPo4CL	-----MNPQ	BEFIIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYVLE	NLS...KHSS
PtQa4CL1	-----MNPQ	EFIFR	SKLPDIYIPK	NLPLHSYVLE	NLS...KHSS
Ri4CL1	-----MAV	PTQPNIIVYR	SKLPDIHIPN	HPLPHSYIFQ	NKS...HLTS
Gm4CL2	-----MAD	DGSRRELIFR	SKLPDIYIPK	HMLPHSYCFE	NLR...ECGS

Ca4CL KD.....YATEND.VK LICIDSA... .PEGC IHF.SELTQS
Vp4CL KD.....YACENG.VK IISIDTTTAA DD.....AANI LHF.SELTQA
Le4CL1 KD.....FSQBNH.VK ICIDDDKI... .DGC LHFSSDLBNS
Pb4CL3 KD.....FARESD.VK VMCVDSAP... .DGC LHF.SELTQA
PtPo4CL R.....FARESD.VK VMCVDSAP... .DGC LHF.SELTQA
PtQa4CL1 KD.....FARESD.VK VMCVDSAP... .DGA SLF.RAHTQA
Ri4CL1 KD.....LSCD.E.VK LMCIDSPDD... .SSC LHF.SELTQS
Gm4CL2 KD.....LR...DIK LVFVDS CPPH TE....EKQH LHFSHLCEDN
PtP14CL1 AD.....L..QSHDVL VITIDDDAPK... .EGC QH1.SVLTEA
Gm4CL1 KS.....FADSSSDVM VMCIDD.DFS YE...NDGV LHF.STLSNA
Lp4CL1 R.HEAFPRI... .GEALT VITIDE..DD GT...PDGC QPFVALVSAA
Os4CL2 RQHEAFPRIID ACTVGDGDTLT VITIDD..DE AT...PKAC LPFWDLIADA
Pb4CL4 RDSYDHENN... .QKPEBDFI VITIDD..P... .PENC LHFNVLVE.A
PtQa4CL2 GDSYCHENN... .QKPEBDFI VITIDD..P... .PENC LHFNVLVE.A
Gm4CL3 RN...HDDG... .AKLGEDFK VVTVDD..P... .PENC LHFVSLVE.A
Gm4CL4 RN...H.DG... .AKLGEDFK VVTVDD..P... .PENC LHFVSLVE.A
Ri4CL3 R.....QEQPHQK VVTIDD..P... .PENC LHFVSLVE.A
Le4CL2 RNTTINESDN KYPKLGEDFK VITIDT..P... .PENC LPFSLIETD
At4CL3 KN.....LGENLT LITIDE..P... .T...PENC LPFSLITIDD
At4CL4 TNL.....KNDGVL IVCLDDDDGN GVVSSDDGC VSF.TELTQA

251 Box I 300

Lp4CL2 ESGERFV... .DEA.VDPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Lp4CL3 ELPE...A... .DEAGVLPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Os4CL1 DEASPLAGDE DDEKVFDPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
At4CL1 TTE...ASEV IDSVEISPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
At4CL2 EEP...RVDI IPE.KISPED VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Pb4CL1 DE...DDI P.AVEINPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Pb4CL2 DE...NEI P.TVKIKPDD IMALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Ri4CL2 DE...SET P.AVINPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Pc4CL1 DE...SEM P.EVINPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Pc4CL2 DE...SEM P.EVIDSDDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Nt4CL DE...HDI P.EVEIQPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Nt4CL2 NE...HDI P.EVEIQPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Nt4CL1 DE...HEI P.EVLIQPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
St4CL DE...HEI P.DVKIQPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Ca4CL DE...HEI P.DVKIQPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Vp4CL DE...NEM P.KVEISPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Le4CL1 DE...TTL P.DVEIRPDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Pb4CL3 DE...NEV P.SPISPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
PtPo4CL DE...NEA P.QVDISPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
PtQa4CL1 DE...NEV P.QVDISPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Ri4CL1 DE...NDV P.DVDISPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Gm4CL2 GD...ADV DVDVDPKDD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
PtP14CL1 DE...TQC PA.VKIHPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Gm4CL1 DE...TEA PA.VKINPDE LVALPSSGT SGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Lp4CL1 DE...NSV PE.SPISPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Os4CL2 DE...GSV PE.VAISPPD PVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Pb4CL4 NE...SEM PT.VSIHPPD PVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
PtQa4CL2 SE...SEM PT.VSIHPPD PVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Gm4CL3 NE...SDA PE.VDIQDD AVAMPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Gm4CL4 NE...SDV PE.VRIHPPD AVAMPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Ri4CL3 NE...NEL PQ.VSIDPPD VVALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
Le4CL2 QE...NQV TS.VSISDND PIALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
At4CL3 ET...NPF QETVDIGDD AALPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ
At4CL4 DETELL... .KPKISPED TVAMPSSGT TGLPKGVMLT HRSLVTSVAQ

301 350

Lp4CL2 QVDGENPNLH F.SSDVLLC VLPLFHIYSL NSVLLAGLRA GCAIVIMKFF
Lp4CL3 LVDGSDNPNV F.NKDDALLC VLPLFHIYSL HTVLLAGLRA GAAIVIMKRF
Os4CL1 QVDGENPNIG L.HAGDVLIC ALPMFHIYSL NTIMMCLGRV GAAIVIMKRF
At4CL1 QVDGENPNLY F.HSDDVILC VLPMFHIYAL NSIMLCLGRV GAAIILMPKF
At4CL2 QVDGENPNLY F.NRDDVILC WPMFHIYAL NSIMLCLSLRI GATILMPKF
Pb4CL1 QVDGENPNLY F.HERDVILC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRV GSAIILMQKF
Pb4CL2 QVDGENPNLY F.HERDVILC VLPLFHIYSL NSVFLCGLRA GSAIILMQKF
Ri4CL2 QVDGENPNLY F.HKEDVILC VLPLFHIYSL NSVFLCGLRV GAAIILMQKF
Pc4CL1 QVDGDNPNLY M.HSEDDVIC ILPLFHIYSL NAVLCCGLRA GVITILMQKF
Pc4CL2 QVDGDNPNLY M.HSEDDVIC ILPLFHIYSL NAVLCCGLRA GVITILMQKF
Nt4CL QVDGENRNLY I.HSEDDVLLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRV GAAIILMQKF
Nt4CL2 QVDGENPNLY I.HSEDDVIC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRV GAAIILMQKF
Nt4CL1 QVDGENANLY M.HSEDDVIC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRV GAAIILMQKF
St4CL QVDGENANLY M.HSEDDVIC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRV GAAIILMQKF
Ca4CL QVDGENANLY M.HSEDDVIC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRI GAAIILMQKF
Vp4CL QVDGENPNLY M.HSEDDVIC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GSGIILMQKF
Le4CL1 QVDGDNANLY M.HSDVLLC TLPLFHIYSM NSILLCGLRV GAAIILMHKF
Pb4CL3 QVDGDNPNLY F.HSEDDVIC VLPMFHIYAL NSIMLCLGRV GASILIMPKF
PtPo4CL QVDGDNPNLY F.HSEDDVIC VLPMFHIYAL NSIMLCLGRV GASILIMPKF
PtQa4CL1 QVDGDNPNLY F.HSEDDVIC VLPMFHIYAL NSMMLCGLRV GASILIMPKF
Ri4CL1 QVDGENPNLY Y.SSDDVLLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GAAIILMQKF
Gm4CL2 QVDGDNPNLY Y.HCHDITLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA KATILIMPKF
PtP14CL1 QVDGENPNLY F.HSDDVILC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GAAIILMQKF
Gm4CL1 LVDGENPHQY T.HSEDDVIC VLPMFHIYAL NSILLCGLRS GAAILIMQKF
Lp4CL1 QVDGENPNLH MRAGEDVLLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GAAVIMLPRF
Os4CL2 EVDGENPNLH MGAG.DVALC VLPLFHIYSL NSVLLSRVP APAVALMPPF
Pb4CL4 QVDGEIPNLY LKQ.DDVVLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GSAVLLMQKF
PtQa4CL2 QVDGEIPNLY LKQ.DDVVLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GSAVLLMQKF
Gm4CL3 QVDGENPNLY LTT.BDVLLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GSAVLLMQKF
Gm4CL4 QVDGENPNLY LTT.BDVLLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GSAVLLMQKF
Ri4CL3 QVDGENPNLY LKG.DDVVLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GAAVIMLPRF
Le4CL2 QVDGDNPNLY LKH.DDVVLC VLPLFHIYSL NSVLLCGLRA GAAVIMLPRF
At4CL3 QVDGDNPNLY LKS.DNVILC VLPLFHIYSL NSVLLSLRS GATVLLMHKF
At4CL4 KVDGENPNLN FT.ANDVILC FLPMFHIYAL DALMLSAMRT GAALLIVPRF

351 400

Lp4CL2 DHGALVDLVR THGVTVAPFV PPIVVEIAKS ARVTAADLAS IRLVMSGAAP
Lp4CL3 DVGALVDLVR AHRITIAFPV PPIVVEIAKS DRVGDADLAS IRLVMSGAAP
Os4CL1 DLAAAMDLVE RHRVTIAPLV PPIVVAVAKS EAAAARDLSS VRMVLGSAAP
At4CL1 EILNLLLELIQ RCKVTIAPVM PPIVLAIAKS SETEKYDLSS IRLVMSGAAP
At4CL2 EITLLELIQI RCKVTIAPVM PPIVLAIAKS PETERKYDLSS VRMVLGSAAP
Pb4CL1 EIVTLMELVQ KYKVTIAPFV PPIVLAIAKS PVVDKYDLSS IRLVMSGAAP

Pb4CL2 DTVSLMDLVQ KYKVTIAPLV PPICLAIAKS PVVDQYDLSS IRTVLSGAAP
Ri4CL2 EINKLLELVE KEKVTIAPFV PPIVLSIAKS PDLHRYDLSS IRLVMSGAAP
Pc4CL1 DIVPFLELIQ KYKVTIAPFV PPIVLAIAKS PVVDKYDLSS IRLVMSGAAP
Pc4CL2 DIVPFLELIQ KYKVTIAPFV PPIVLAIAKS PVVDKYDLSS IRLVMSGAAP
Nt4CL DIVPFLELIQ NYKVTIAPFV PPIVLAIAKS PMVDDYDLSS IRLVMSGAAP
Nt4CL2 DIVPFLELIQ RYKVTIAPFV PPIVLAIAKS PMVDDYDLSS IRLVMSGAAP
Nt4CL1 DIAPFLELIQ KYKVSIAFV PPIVLAIAKS PIVSDYDLSS IRLVMSGAAP
St4CL DIAQFLELIP KHKVTIAPFV PPIVLAIAKS PLVDNYDLSS IRLVMSGAAP
Ca4CL DIVHFELELIQ KYKVTIAPFV PPIVLAIAKS PLVDHYDLSS IRLVMSGAAP
Vp4CL EIVPFLELIQ KYKVTIAPFV PPIVLAIAKS TVVDNYDLSS IRLVMSGAAP
Le4CL1 EIVTFLELIQ RYKVTIAPFV PPIVLAIAKS NVVDQYDLST IRLVMSGAAP
Pb4CL3 DIGTLLGLIE KYKVSIAFV PPIVLAIAKS PFDPKHDLSS LRMIKSGGAP
PtPo4CL EIGTLLGLIE KYKVSIAFV PPIVLAIAKS PDLDKHDLSS LRMIKSGGAP
PtQa4CL1 EIGSLLGLIE KYKVSIAFV PPIVLAIAKS PDLDKHDLSS LRMIKSGGAP
Ri4CL1 EIVSLELEMQ KHRVSVAPIV PPIVLAIAKS PDLDKYDLSS IRLVMSGAAP
Gm4CL2 DINSLALIH KHKVTIAPFV PPIVLAIAKS PDLHYDLSS IRLVMSGAAP
PtP14CL1 NLTTCLELIQ KYKVTIAPFV PPIVLAIAKS PIVSQYDLSS VRIIMSGAAP
Gm4CL1 EITLLELIE KYKVTIAPFV PPIVLAIAKS GETHRYDLSS IRAVVTAAP
Lp4CL1 EMGAMLEGIE RWRVTVAUV PPIVLAIAKS PVGKHDLSS IRLVMSGAAP
Os4CL2 EMGAMGAE RWRVTVAUV PPIVLAIAKS PFVERHDLSS IRLVMSGAAP
Pb4CL4 EIGSLELIQ KHNVSVAUV PPIVLAIAKS PMANFDLSS IRLVMSGAAP
PtQa4CL2 EIGSLELIQ KHNVSVAUV PPIVLAIAKS PLEANFDLSS IRLVMSGAAP
Gm4CL3 EIGTLELIQ RHRVSVAMV PPIVLAIAKS PMVADFDLSS IRLVMSGAAP
Gm4CL4 EIGTLELIQ RHRVSVAMV PPIVLAIAKS PMVADFDLSS IRLVMSGAAP
Ri4CL3 EIGTLELIQ RYRVCGGG CLAGDSAGE SMVADYDLSS IRLVMSGAAP
Le4CL2 EIGALLELIQ RHRVSVAMV PPIVLAIAKS PMVDKYDLSS IRLVMSGAAP
At4CL3 EIGALLDLI RHRVTIAPLV PPIVLAIAKS PTVNSYDLSS VRFVLSGAAP
At4CL4 EILNLMELI QYKVTIAPFV PPIVLAIAKS PETERYDLSS VRIMLSGAAT

401 * * 450

Lp4CL2 MGKELQDAFM AKIPNAVLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFAVKSAGSC
Lp4CL3 MGKDLQDAFM AKIPNAVLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFKVKSAGSC
Os4CL1 MGKDIEDAFM AKLPGAVLQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFKVKSAGSC
At4CL1 LGKELEDVAV AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMSLGFAKE PFPVKSAGSC
At4CL2 LGKELEDAIS AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMSLGFAKE PFPVKSAGSC
Pb4CL1 MGKELEDTV AKLPAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFEIKSAGSC
Pb4CL2 LGKELEDTV AKLPAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFEIKSAGSC
Ri4CL2 LGKELEDTV AKLPAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFEIKSAGSC
Pc4CL1 LGKELEDAVR AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFEIKSAGSC
Pc4CL2 LGKELEDAVR AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFEIKSAGSC
Nt4CL LGKELEDTV AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFEIKSAGSC
Nt4CL2 LGKELEDTV AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFEIKSAGSC
Nt4CL1 LGKELEDAVR AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFDIKSAGSC
St4CL LGKELEDAVR AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFDIKSAGSC
Ca4CL LGKELEDAVR AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFDIKSAGSC
Vp4CL LGKELEDAVR AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFDIKSAGSC
Le4CL1 LGSELEDAVR AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFDIKSAGSC
Pb4CL3 LGKELEDTV AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFDIKSAGSC
PtPo4CL LGKELEDTV AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFDIKSAGSC
PtQa4CL1 LGKELEDTV AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMCLAFAKE PFDIKSAGSC
Ri4CL1 LGKELEDTV AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMSLAFAKE PFEVKSAGSC
Gm4CL2 LGKELEDTV AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMSLAFAKE PIDVKSAGSC
PtP14CL1 LGKELEDAVR AKFPNAKLGQ GYGMEAGV LAMSLAFAKE PFPVKSAGSC
Gm4CL1 LGGELQAVK ARLPHTFGQ GYGMEAGV LAMSLAFAKE PFKIKSAGSC
Lp4CL1 LGKELEDAVR ARLPHTFGQ GYGMEAGV LAMSLAFAKE PFPVKSAGSC
Os4CL2 LGKELEDAVR ARLPHTFGQ GYGMEAGV LAMSLAFAKE PFPVKSAGSC
Pb4CL4 LGKELEDAVR SRVPAQLGQ GYGMEAGV LAMSLAFASKQ PFPVKSAGSC
PtQa4CL2 LGKELEDAVR SRVPAQLGQ GYGMEAGV LAMSLAFASKQ PFPVKSAGSC
Gm4CL3 LGKELVEAL NRVPQAVLQ GYGMEAGV LAMSLAFASKQ PFPVKSAGSC
Gm4CL4 LGKELEDAVR NRVPQAVLQ GYGMEAGV LAMSLAFASKQ PFPVKSAGSC
Ri4CL3 LGKELEDAVR NRVPQAVLQ GYGMEAGV LAMSLAFASKQ PFPVKSAGSC
Le4CL2 LGRELELALL NRVPHTFGQ GYGMEAGV LAMSLAFASKQ PFPVKSAGSC
At4CL3 LGKELQDSL RRLPQAILGQ GYGMEAGV LAMSLAFASKQ PFPVKSAGSC
At4CL4 LKKELEDAVR LKFPNAIFGQ GYGMEAGV LAMSLAFASKQ PFPVKSAGSC

451 Box II 500

Lp4CL2 TVVRNAELKI VDPDTGASLG RNQGEICIR GQIMKGYLN DPVATKNTID
Lp4CL3 TVVRNAELKV VDPDTGASLG RNQGEICIR GQIMKGYLN DEPSTKNTID
Os4CL1 TVVRNAELKI IDPDTGKSLG RNQGEICIR GQIMKGYLN NPEATKNTID
At4CL1 TVVRNAEMKI VDPDTGDSLS RNQGEICIR GQIMKGYLN DPAAATKNTID
At4CL2 TVVRNAEMKI LDPTGDSLS RNQGEICIR GQIMKGYLN DLATASTID
Pb4CL1 TVVRNAEMKI VDPDTGRSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
Pb4CL2 TVVRNAEMKI VDPDTGESQP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
Ri4CL2 TVVRNAEMKI IDPDTNESLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
Pc4CL1 TVVRNAEMKI VDPETNASLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEESTRTID
Pc4CL2 TVVRNAEMKI VDPETNASLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEESTRTID
Nt4CL TVVRNAEMKI VDPETGNSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATARTID
Nt4CL2 TVVRNAEMKI VDPKTGNSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATARTID
Nt4CL1 TVVRNAEMKI VDPDTGCSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATARTID
St4CL TVVRNAEMKI VDPDTGCSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATARTID
Ca4CL TGARNAEMKN VDPDTGCSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN HLESTRTID
Vp4CL TVVRNAEMKI VDPETGNSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATARTID
Le4CL1 TVVRNSEMKI IDTETGASLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
Pb4CL3 TVVRNAEMKI VDPETGASLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
PtPo4CL TVVRNAEMKI VDPETGASLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
PtQa4CL1 TVVRNAEMKI VDPETGVSPL RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
Ri4CL1 TVVRNAELKI VDPETGASLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
Gm4CL2 TVVRNAEMKI VDPETGHSPL RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
PtP14CL1 TVVRNAEIKI LDTEGHSPL RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATASTID
Gm4CL1 TVVRNAEMKI VDETGDSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
Lp4CL1 TVVRNAQLKV VDPDTGVSGL RNQGEICIR GQIMKGYLN DPVATASTID
Os4CL2 TVVRNAELKV VDPDTGFSGL RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATASTID
Pb4CL4 TVVRNAELKV IDPDTGSSGL RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATASTID
PtQa4CL2 TVVRNAELKV IDPDTGFSGL RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATASTID
Gm4CL3 TVVRNAELKV VDPETGRSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEKATALTID
Gm4CL4 TVVRNAELKV VDPETGRSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATASTID
Ri4CL3 TVVRNAELKV VEPETGRSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATERTVD
Le4CL2 TVVRNADLKV IDPDTGSSGL RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATARTID
At4CL3 TVVRNAELKV VHELTRSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATARTID
At4CL4 TVVRNAEMKV VDETGTSLP RNQGEICIR GQIMKGYLN DEATARTID

1501				1550	
Lp4CL2	KDGLWHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	YKGFQVPVPAE	LEALLITHPE
Lp4CL3	KDGLWHTGDI	GLVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	YKGFQVPVPAE	LEALLINTPE
Os4CL1	ADGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	YRGFQVAPAE	LEALLNTHPS
At4CL1	KDGLWHTGDI	GLIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLIGHPD
At4CL2	KDGLWHTGDI	GFIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLIGHPE
Pb4CL1	NDGWLHTGDI	GYIDGDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEAMLIAHPD
Pb4CL2	KDGLWHTGDI	GYID, EDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEAMLIAHPN
Ri4CL2	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEAMLIHPN
Pc4CL1	KEGWLHTGDI	GFIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLTHPT
Pc4CL2	KEGWLHTGDI	GFIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLTHPT
Nt4CL2	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLLNHPN
Nt4CL1	KEGWLHTGDI	GFIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLLNHPN
St4CL	KEGWLHTGDI	GFIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLLNHPN
Ca4CL	KEGWLHTGDI	GFIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLLNHPN
Vp4CL	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLTHPC
Le4CL1	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLVPHN
Pb4CL3	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLIAHP
PtPo4CL	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLIAHP
PtQa4CL1	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLIAHP
Ri4CL1	KEGWLHTGDI	GFIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLVTHN
Gm4CL2	KDGLWHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLTHPK
PtPi4CL1	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLVTHN
Gm4CL1	KEGWLHTGDI	GYIDDDDEL	IVDRLKEIIK	YKGFQVAPAE	LEALLIAHPN
Lp4CL1	VEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEALLIAHP
Os4CL2	VEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEALLIAHP
Pb4CL4	VEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEALLVNHPS
PtQa4CL2	VEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEALLVNHPS
Gm4CL3	SEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEGLLVSHPS
Gm4CL4	SEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEGLLVSHPS
Ri4CL3	VEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEGLLVSHPS
Le4CL2	VEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEALLISHPN
At4CL3	VEGWLHTGDI	GYVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVPPAE	LEALLINHPN
At4CL4	KDGLWHTGDI	GFVDDDDDEF	IVDRLKEIIK	FKGFQVAPAE	LEALLISHPS

Pb4CL4	KQVVFYKRLH	KVFFVHSIPK	SASGKILRKD	LRAKLATATT	MSD-----
PtQa4CL2	KQVVFYKRLH	KVFFVHSIPK	SASGKILRKD	LRAKLATATT	MSD-----
Gm4CL3	KQVVFYKRLH	KVFFVHAIPK	SPSGKILRKD	LRAKLETAAT	QTPF-----
Gm4CL4	KQVVFYKRLH	KVFFVHAIPK	SPSGKILRKD	LRAKLETAAT	QTPF-----
Ri4CL3	KQVVFYKRLH	KVFFVHAIPK	SPAGKILRKD	LRAKLAATAA	PNPHPIP---
Le4CL2	KQVVFYKRLH	KVFFVHSIPK	SPSGKILRKD	LRAKLAATAA	ST-----
At4CL3	KQVVFYKRLH	KVFFVHSIPK	SPSGKILRKD	LRAKLAATAA	ST-----
At4CL4	KQVVFYKRLH	KVFFVHSIPK	SPSGKILRKD	LRAKLAATAA	ST-----

Sequenzvergleich der zwei bekannten Sinapat umsetzenden 4CLs auf Aminosäureebene

Dargestellt ist der Aminosäurevergleich der beiden einzigen bereits klonierten und bekannten Sinapat umsetzenden 4CLs sowie der Konsensussequenz, die sich aus einem Vergleich bekannter 4CLs ergibt. Der Vergleich enthält alle bekannten und annotierten pflanzlichen 4CLs, sowie drei weitere im Rahmen dieser Arbeit aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit identifizierten und annotierten Reis 4CLs. Die einzige Position, in der die beiden Sinapat umsetzenden 4CLs sich ausschließlich und gemeinsam von allen anderen 4CLs unterscheiden ist farbig und durch einen Stern hervorgehoben.

Die Consensussequenz wurde mit dem Programm pretty (Parameter: Plurality: 2.00 Threshold: 3 AveWeight 1.00 AveMatch 2.78 AveMisMatch -2.25; Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.) berechnet.

					150
Gm4CL1	-----	-----	-----	-----	-----
At4CL4	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
					100
Gm4CL1	-----	-----	-----	-----	-----
At4CL4	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
					200
Gm4CL1	-----	-----	-----	-----	-----
At4CL4	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
					300
Gm4CL1	-----	-----	-----	-----	-----
At4CL4	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
					400
Gm4CL1	-----	-----	-----	-----	-----
At4CL4	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
					500
Gm4CL1	-----	-----	-----	-----	-----
At4CL4	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
					600
Gm4CL1	-----	-----	-----	-----	-----
At4CL4	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----

Danke!

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis März 2003 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Biochemie unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Hahlbrock angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hahlbrock danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die fantastischen Arbeitsbedingungen. Seine Persönlichkeit und der sehr interessierte und persönliche Umgang mit seinen Mitarbeitern schaffte den Boden für eine sehr freie und anregende Arbeitsatmosphäre. Seine engagierte Betreuung ging weit über eine Unterstützung hinaus und seine Diplomatie in den Diskussionen war in vielerlei Hinsicht wertvoll. Besonders aber war es auch die wissenschaftliche Freiheit, die ich in den letzten Jahren sehr genossen habe.

Bei Frau Prof. Dr. S. Waffenschmidt möchte ich für die Übernahme des Koreferates und ihr Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Allen Mitgliedern unserer Biochemie Abteilung danke ich für die wertvollen Diskussionen, und Anregungen, Hilfestellungen und das großartige Klima. All dies trug entscheidend mit zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Dr. Pawel Bednarek danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der HPLC-Läufe, der Interpretation manch unerwarteter Spektren und für die Wiedererweckung einer lange vernachlässigten Chemie.

Im besonderen möchte ich Elke Logemann für alle wertvollen Tips und Ratschläge und besonders gute Zusammenarbeit danken.

Auch Andreas Heise gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit, viele Diskussionen und ein besonders herzliches Laborklima.

Obwohl die Zeit mit Jens Hagemeyer kurz war, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Besonders aber für das Schmackhaftmachen der Idee, doch etwas mit Sekundärstoffwechsel und der ersten 4CL-Nullmutante anzufangen.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine außerordentlich freundliche Arbeitsatmosphäre und für die ständige Hilfsbereitschaft danken. Bekir Ülker und Dierk Wanke, euch vielen Dank dafür, dass Ihr zu jeder Tages- und Nachtzeit mitgeholfen habt neue Ideen auszutüfteln, so manchen Einblick in Strategien zur Problemlösung und in die Botanik und Evolution habe ich Euch zu verdanken.

Ein ganz lieber Dank an Britta, die mich die ganze Zeit über unterstützte, die mir den Rücken frei gehalten hat, lange Arbeitsperioden recht klaglos tolerierte und mich – zumeist erfolgreich- motivierte, wenn mal wieder eine Mutante nicht so wollte, wie ich es mir vorstellte.

Und zu guter Letzt, meinen lieben Eltern, Reinhard und Renate. Die Kombination aus der tollen Unterstützung und dem absoluten Rückhalt gaben mir die Freiheit, die das hier alles erst möglich machte.

Abstract

The aim of this project was to analyze *in vivo* the function of the three known isoforms of *A. thaliana* 4-coumarate:CoA ligases (*At4CLs*). *In silico* analyses led to the discovery of a fourth isoform, *At4CL4*. A model describing the evolution of the *At4CL*-family was proposed and it was further suggested that *At4CL4* completes the *At4CL* family. The heterologously expressed enzyme possesses an unusual substrate utilization pattern. To date, *At4CL4* and a recently published soybean 4CL are the only known heterologously expressed 4CLs that exhibit conversion of sinapate. The expression pattern of *At4CL4* was comparable to *At4CL1* and *At4CL2*. Together with the substrate preference, this suggests association of *At4CL4* with the class I isoforms. Additionally to an existing *At4CL1* knockout line, at least one stable mutant was isolated for every member of the *At4CLs*, morphologically and biochemically characterized. Biochemical analysis using HPLC identified an additional compound in the soluble metabolite fraction of *At4CL1* knockout line roots with an UV-spectrum similar to that of coumarin. In *At4CL3* knockout lines, a strong decrease of flavonoids, depending on age and tissue was observed. Additionally, *At4CL3* knockout lines lack UV-inducibility of the flavonoid biosynthesis. This supports a function of *At4CL3* in the flavonoid biosynthesis in young plants and after UV-perception. Multiple mutants were generated by combining different single knockout lines (*AtCHS*, *tt4*; *AtF5H*, *fah1-2*) with the *At4CL* lines to overcome the described functional redundancies. One combination was selected for further morphological and biochemical analysis. Homozygous *At4CL1/At4CL2* double knockout lines showed an arrest of growth at the developmental stage of five weeks. Three additional compounds with UV-Spectra similar those of ferulate and 4-coumarate occurred in soluble secondary metabolite fractions of these lines. These results suggest a function of *At4CL1* and *At4CL2* in the biosynthesis of lignin precursors.

Kurzzusammenfassung

Ziel des Projekts war die Aufschlüsselung der *in vivo*-Funktionen der drei bekannten *A. thaliana* 4-Cumarat:CoA Ligasen. *In silico* Untersuchungen führten zur Entdeckung einer weiteren, wahrscheinlich letzten Isoform, *At4CL4*. Ergebnisse der phylogenetischen und genomischen Analysen positionierten *At4CL4* in die Klasse I der 4CLs und ein Modell wurde vorgeschlagen, das die Evolution der *At4CL*-Familie beschreibt. Heterolog exprimiertes *At4CL4* wurde enzymkinetisch als *bona fide* 4CL charakterisiert, mit der besonderen Fähigkeit *in vitro* Sinapinsäure zu aktivieren. Der *At4CL4*-katalysierten Aktivierung von Sinpat bzw. Ferulat könnte eine Rolle im Stoffwechselweg zu Sinpat-Derivaten oder Ligninvorstufen zukommen. Auf RT-PCR Ebene wurde die mRNA-Akkumulation der *At4CLs* untersucht. *At4CL4* zeigte ein Muster ähnlich dem der *At4CL1* und der *At4CL2* Dieses lässt eine *in vivo* Funktion der *At4CL4* assoziiert mit der Synthese von Ligninvorstufen und anderen phenolischen Verbindungen erwarten. Neben der bereits existierenden *At4CL1*-Nullmutante wurde zu jedem weiteren Mitglied der *At4CL*-Familie mindestens eine weitere Linie isoliert, molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert. In methanolischen Extrakten löslicher Sekundärmetabolite aus Wurzeln der *At4CL1* Mutante wurde Akkumulation einer Verbindung mit einem UV-Spektrum ähnlich dem des Coumarins nachgewiesen In den HPLC-Profilen der *At4CL3*-Nullmutante wurde die Reduktion, nicht aber vollständiges Fehlen von Flavonoiden nachgewiesen. Die Ausprägung des *At4CL3*-Nullmutanten-Phänotyps war in verschiedenen Organen und Entwicklungsstufen unterschiedlich stark. Auch zeigte die *At4CL3*-Nullmutante keine UV-induzierbare Akkumulation von Flavonoiden. Eine Funktion der *At4CL3* kann daher in in der Aktivierung von Flavonoid-Vorstufen in jungen Pflanzen und nach UV-Perzeption bestehen. Um die funktionellen Redundanzen zu überwinden, wurden multiple Nullmutanten der *At4CLs* mit Mutanten der Gene *AtCHS* und *AtF5H* generiert, um weitere strategische Punkte des Metabolitenflusses abzudecken. Morphologische und biochemische Charakterisierung ausgewählter Mutanten zeigte, dass ein homozygoter Defekt von *At4CL1/At4CL2* zum Stagnieren der pflanzlichen Entwicklung im Alter von 5-6 Wochen führte. In HPLC-Profilen konnte hier die spezifische Akkumulation von drei Verbindungen nachgewiesen werden, die vermutlich 4-Cumarat- und Ferulat-Derivate darstellen. Daraus wurde geschlossen, dass Funktionen von *At4CL1* und *At4CL2* in der Synthese von Ligninvorstufen und weiteren phenolischen Verbindungen der späten Entwicklungsstadien bestehen.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der gültigen Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation wurde am Max-Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln, Vogelsang angefertigt und wurde von Prof. Dr. Klaus Hahlbrock betreut.

Geburtsdatum: 7. Februar 1971

Geburtsort: Ränderoth

Nationalität: Deutsch

Marital Status: Ledig

Ausbildung 1991 Abitur, staatl. Wilhelm v. Humboldt Gymnasium

1991 Zivildienst / ISB

1991 - 1998 Studiengang Chemie, Dipl., Universität Köln

Arbeiten 1998 Diplomarbeit am Max-Planck Institut für Züchtungsforschung, Abteilung Biochemie "Versuche zur intrazellularen Lokalisation eines mutmaßlich an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligten Proteins"

1999 Beginn der Promotionsarbeit am Max-Planck Institut für Züchtungsforschung, Abteilung Biochemie mit dem Arbeitstitel "The Identification, Isolation and Characterisation of 4-Coumarate CoA Ligase Null mutants in *Arabidopsis thaliana*" zur Erlangung der Promotion der Mat.Nat.Fakultät der Universität Köln

Seminare und Lehrerfahrung

- The norcaradien-cycloheptatrien structural problem; Universität Köln, OC
- Transition-metal alkan complexes; Universität Köln, AC
- Volatile sesquiterpene compounds as a signal for herbivore attack; Universität Köln, BC
- From conventional breeding to transgenic plants; Institut für Biologie und Medizin, Köln
- The polymerase chain reaction and modern methods; Institut für Biologie und Medizin, Köln
- Viruses: Paradigms for cellular functions; Max-Planck Institut für Züchtungsforschung, Köln
- RT-PCR, application and special methods; Institut für Biologie und Medizin, Köln
- Molecular Biology: training program for technicians, Level I; BASF Plant Science, Ludwigshafen

Internationale und nationale Treffen

- PhD-Meeting 2001 University of Piacenza (Italy) and the Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, Köln: "Secondary Metabolites in *Arabidopsis*"
- Max-Planck-Institute's Meeting 2001: "Secondary metabolites in *Arabidopsis*-pathogen interactions and the role of 4CLs in phenylpropanoid metabolism."
- Organization and coordination, Germany: PhD-Meeting 2001 ASCR/MPG The Academy of Science of the Czech Republic/ The Max-Planck Society
- Co-organization, Köln: PhD-Meeting 2002 PAS/MPG The Polish Academy of Science/ The Max-Planck Society
- 15. Plant Molecular Biology Meeting, Dabringhausen: "The *in-vivo* role of the *Arabidopsis* 4CLs"
- 29th annual conference "Progress in Molecular Biology" 2002, Jagellonian University, Krakow (Poland), Poster
- International Ph.D. Workshop, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, "Centre of Excellence in Molecular Biotechnology BIER", Krakow (Poland)
- Max-Planck-Institute's Meeting 2002, Poster