

Klonierung von *O*-Methyltransferasen zur Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* L.

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Marc Hehmann

aus Georgsmarienhütte

Marburg an der Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 24. Juni 2004 angenommen.

Erstgutachter: Herr Professor Dr. Ulrich Matern
Zweitgutachter: Herr Professor Dr. Alfred Batschauer
Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2004

Wesentliche Auszüge dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hermann, M., Lukacin, R., Ekiert, H., Matern, U. (2004):
Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L. Cloning of bergaptol *O*-methyltransferase.
Eur. J. Biochem. **271**, 932-940.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung.....	1
A.1 <i>Ammi majus</i> L., das Bischofskraut – Bedeutung und Inhaltsstoffe....	1
A.2 Furanocumarine	3
A.2.1 Verbreitung	3
A.2.2 Struktur	4
A.2.3 Wirkung von linearen Furanocumarinen	6
A.2.4 Medizinische Anwendung der Furanocumarine	8
A.2.5 Furanocumarine als Phytoalexine	10
A.2.6 Furanocumarine in der Interaktion mit Insekten	13
A.3 Biosyntheseweg von linearen Furanocumarinen	15
A.3.1 Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel	15
A.3.2 Biosynthese des Umbelliferons	17
A.3.3 Prenylierung von Umbelliferon	18
A.3.4 Marmesin und Psoralen	18
A.3.5 Hydroxylierung und <i>O</i> -Methylierung des Psoralens	20
A.4 <i>O</i>-Methyltransferasen (OMTn).....	22
A.4.1 Vorkommen und Bedeutung von OMTn	22
A.4.2 Einteilung und Nomenklatur	24
A.4.3 Aufbau und Struktur pflanzlicher OMTn	25
A.4.4 Regenerationszyklus des SAM	31
A.5 Zielsetzung der Arbeit	32
B. Material.....	33
B.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	33
B.2 Radiochemikalien	34
B.3 Substrate.....	34
B.4 Enzyme	35
B.5 Kommerzielle Reaktionssätze	35

B.6	Bakterienstämme	36
B.6.1	<i>E.coli</i> zur Klonierung	36
B.6.2	<i>E.coli</i> zur Expression	36
B.7	Vektoren	37
B.7.1	<i>E.coli</i> -Vektoren	37
B.7.2	<i>E.coli</i> -Expressionsvektor	38
B.8	Puffer und sonstige Lösungen	39
B.8.1	Pflanzen- und Zellaufschluss.....	39
B.8.2	Herstellung kompetenter Zellen.....	39
B.8.3	RNA-Isolierung	39
B.8.4	Plasmid-DNA-Isolierung	40
B.8.5	Dot-Blot	41
B.8.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
B.8.7	Säulenchromatographie.....	42
B.8.8	Sonstige Puffer und Lösungen	42
B.9	Medien	43
B.9.1	Bakterien	43
B.9.2	Pflanzliche Zellkulturen	43
B.10	Dünnschichtchromatographie	44
B.11	Geräte	44
C.	Methoden	45
C.1	Suspensionskulturen	45
C.1.1	Anzucht der Zellen.....	45
C.1.2	Induktion	45
C.1.3	Ernte und Lagerung	45
C.2	Gewebe von Frischpflanzen	45
C.3	Aufschluss von pflanzlichen Zellen und Geweben	46
C.3.1	Aufschluss mit Polyclar	46
C.3.2	Aufschluss mit Dowex/Quarzsand.....	46

C.4	Molekularbiologische Methoden.....	47
C.4.1	Konzentration von Nukleinsäuren	47
C.4.2	Anzucht von <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	47
C.4.3	Herstellung kompetenter Zellen.....	47
C.4.4	RNA-Isolierung	48
C.4.5	Reverse Transkription.....	49
C.4.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	50
C.4.7	Plasmidisolierung	53
C.4.8	Sequenzanalysen.....	54
C.4.9	Northern-Analyse.....	55
C.4.10	Mutagenese.....	55
C.4.11	Heterologe Expression	56
C.5	Biochemische Methoden	59
C.5.1	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	59
C.5.2	Enzymtests	60
C.5.3	Gelpermeations-Chromatographie (GPC) an Fractogel EMD BioSEC (S).....	61
C.5.4	Stabilität der BMT	62
C.5.5	Charakterisierung der nativen und rekombinanten Enzyme	63
C.6	Sonstiges	65
C.6.1	Radioaktivmessungen	65
D.	Ergebnisse.....	66
D.1	Enzymatische Voruntersuchungen.....	66
D.1.1	Induktion von BMT und XMT in <i>Ammi majus</i> Zellkultur	66
D.1.2	Bestimmung der pH- und Temperaturabhängigkeit von BMT und XMT	68
D.1.3	Induktion von COMT und CCoAOMT in <i>Ammi majus</i> Zellkultur	71
D.1.4	COMT-Aktivität in Suspensionszellkulturen und <i>A. majus</i> Gewebe	72
D.2	Klonierung von OMTn.....	74
D.2.1	Amplifizierung OMT-spezifischer Fragmente	74
D.2.2	Gewinnung der vollständigen Sequenzen	74
D.3	Sequenzanalysen.....	77
D.3.1	BMT	77
D.3.2	COMT	81
D.3.3	CCoAOMT	86
D.3.4	COMT2 (COMT-ähnliches-Protein)	89
D.4	Northern-Analyse	93

D.5	Heterologe Expression.....	97
D.5.1	Klonierung in den Expressionsvektor	97
D.5.2	SDS-PAGE der rekombinanten Enzyme	98
D.5.3	Identität und Substratspezifität der rekombinanten OMTn	100
D.6	Partielle Reinigung der BMT.....	102
D.6.1	Ammoniumsulfatfällung.....	102
D.6.2	Chromatographie an Fractogel EMD BioSEC.....	102
D.7	Apparente Molekularmasse von BMT und COMT	105
D.8	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten OMTn.....	106
D.8.1.	BMT	106
D.8.2	COMT	111
E.	Diskussion.....	118
E.1	Strategien zum Klonieren pflanzlicher OMTn.....	119
E.2	Klonierung von OMTn aus <i>Ammi majus</i> L.....	120
E.3	Expression der OMTn in <i>E. coli</i>	121
E.4	Bergaptol <i>O</i>-Methyltransferase	123
E.5	Kaffeensäure <i>O</i>-Methyltransferase.....	128
E.6	Caffeoyl-CoA <i>O</i>-Methyltransferase.....	131
E.7	Kaffeensäure <i>O</i>-Methyltransferase-ähnliches Enzym	133
E.6	Sequenzanalyse der Substratbindestellen.....	134
E.9	Möglichkeiten zur Klonierung der XMT.....	136
E.10	Furanocumarine in Nutzpflanzen.....	137
F.	Zusammenfassung.....	139
G.	Literaturverzeichnis	141

Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Cumarsäure:CoA Ligase
A	Absorption
Amn	<i>Ammi majus neu</i> Zellkultur
amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
BMT	Bergaptol <i>O</i> -Methyltransferase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CAD	Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase
CCoAOMT	Caffeoyl-CoA <i>O</i> -Methyltransferase
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
ChOMT	Chalcon- <i>O</i> -Methyltransferase
CMT	<i>C</i> -Methyltransferase
COMT	Kaffeensäure <i>O</i> -Methyltransferase
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
CYP 450	Cytochrom P450
Cyt	Cytochrom
Da	Dalton
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute (dots per minute)
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DOX-Weg	1-Deoxy-D-xylulose-Weg
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GSP	genspezifischer Primer
h	Stunde(n) (hour(s))
HR	hypertensive Reaktion (hypertensive response)
IOMT	Isoflavon <i>O</i> -Methyltransferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kan	Kanamycin
kat	Katal
kDa	Kilodalton
Km	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
M	molar
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)

min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propanschwefelsäure
Mr	relative Molekularmasse
MS	Multiple Sklerose
mRNA	Boten-RNA (messenger ribonucleic acid)
NAA	a-Naphthylessigsäure
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
nm	Nanometer
NMT	N-Methyltransferase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OMT	O-Methyltransferase
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin Ammoniak-Lyase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pmg</i>	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i> (syn. <i>P. sojae</i>)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Rf	Retentionsfaktor (Laufstrecke der Substanz / Laufstrecke der Front)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA (ribosomal ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SEC	Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography)
SMT	S-Methyltransferase
syn.	Synonym
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetrazyklin
tRNA	Transfer-RNA (transfer-ribonucleic acid)
Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
XMT	Xanthotoxol O-Methyltransferase
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Abkürzungen der Aminosäuren:

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Abkürzungen der Nukleoside:

Adenosin	A
Cytidin	C
Guanosin	G
Thymidin	T
Uridin	U

Genbankeinträge der *Ammi majus* L. O-Methyltransferasen

Bergaptol O-Methyltransferase (BMT)	AY443006
Kaffeesäure O-Methyltransferase (COMT)	AY443007
Kaffeesäure O-Methyltransferase ähnliches Protein (COMT2)	AY443008
Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase (CCoAOMT)	AY620245

A. Einleitung

A.1 *Ammi majus* L., das Bischofskraut – Bedeutung und Inhaltsstoffe

Ammi majus L., das Bischofskraut (**Abb. 1**), auch als große Knorpelmöhre bezeichnet, gehört zur Familie der Apiaceae (Doldengewächse). Kennzeichnende Merkmale dieser Familie sind einfache oder zusammengesetzte Dolden mit in Köpfchen zusammenstehenden Blüten sowie von Ölgängen durchzogene Spaltfrüchte. Die bekanntesten Vertreter der Apiaceae, *Pimpinella anisum* L. (Anis), *Petroselinum crispum* L. (Petersilie) und *Apium graveolens* L. (Sellerie), werden als Gewürze und Gemüse, oder auch zu medizinischen Zwecken verwendet. Chemotaxonomisch zeichnen sich die Vertreter der Apiaceae durch das Vorkommen von ätherischem Öl, Flavonoiden und Furanocumarinen aus.



Abbildung 1: *Ammi majus* L.

Standort: Alter Botanischer Garten der Philipps-Universität Marburg

Bei *Ammi majus* L. handelt es sich um eine 20-80 cm hohe, nicht verholzte Staude mit einfach bis doppelt gefiederten Grundblättern und breit elliptischen, gesägten Fiederblättern. Die Blüten sind weiß und stehen in bis zu 80-strahligen Dolden (Blütezeit: Juli-September). Die Pflanze stammt ursprünglich aus dem südeuropäischen Mittelmeerraum und nördlichen Afrika, ist allerdings bereits in Mitteleuropa verbreitet und wird heute auch in Argentinien, Australien und den südlichen Teilen der USA, meist als Unkraut, gefunden. Verwendet wurde *A. majus*, wie *A. visnaga*, früher bei Bronchialasthma. Überliefert aus der Volksheilkunde finden die Früchte als Teeaufguss noch heute Anwendung als Karminativum, Stomachikum sowie zur Regulierung der Menstruation. In Marokko wird der Auszug als antibakterielle Mundspülung, in Indien ein Samensud als „Pille danach“ verwendet.

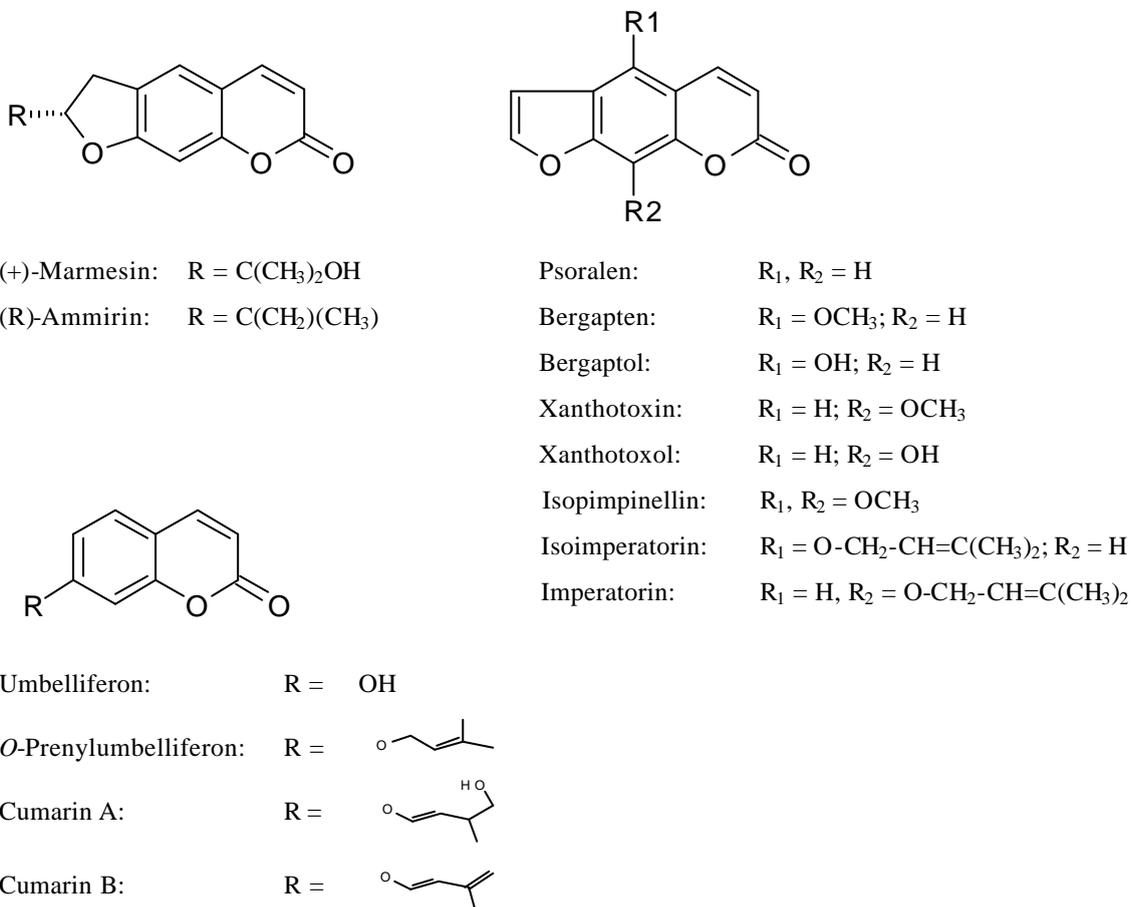


Abbildung 2: Furanocumarine und Umbelliferon-Ether aus *Ammi majus* L.

Xanthotoxol konnte sowohl aus den Samen (Ivie *et al.*, 1978) als auch aus der Pflanze (Schönberg & Sina, 1948) isoliert werden. Bergaptol und Xanthotoxol stellen Zwischenprodukte in der Biosynthese des Bergaptens und Xanthotoxins dar (Thompson *et al.*, 1978). Die Umbelliferon-Ether Cumarin A und B entstehen in induzierten Zellkulturen durch Prenylierungsreaktionen aus Umbelliferon (Hamerski *et al.*, 1990b).

Neben verschiedenen Flavonoiden aus den oberirdischen Teilen der Pflanze (Singab, 1998), ist die Vielzahl der linearen Furanocumarine (**Abb. 2**) auffallend. Sie kommen vorwiegend in den Früchten und Samen vor. Angefangen mit dem Xanthotoxin (Schönberg & Sina, 1948) konnten aus *A. majus* L. über 20 Furanocumarine und deren glykosidische Verbindungen mit unterschiedlich ausgeprägter Phototoxizität isoliert werden (Fahmy *et al.*, 1948; Abu Mustafa, 1975a,b; Ivie, 1978; Elgamal *et al.*, 1993). Die Früchte zählen daher zu den Hauptquellen an linearen Furanocumarinen (Ekiert & Gomolka, 2000).

Durch die Etablierung von Zellsuspensionskulturen und „*hairy root*“-Kulturen wurden Systeme geschaffen, die genetisch stabil und zur schnellen Produktion von Furanocumarinen befähigt sind (Hamerski, 1989; Królicka *et al.*, 2001). Neben den Furanocumarinen konnten mit dem Cumarin A und B zwei nur in *A. majus* L. vorkommende Umbelliferon-Ether (**Abb. 2**) aus Zellkulturen isoliert werden (Hamerski *et al.*, 1990b).

A.2 Furanocumarine

A.2.1 Verbreitung

Reich an linearen und angulären Furanocumarinen sind Gattungen aus den Familien der Apiaceae, Rutaceae und Moraceae (Murray *et al.*, 1982). Allein unter den Apiaceae sind mehr als 55 Spezies bekannt. Neben *Ammi majus* L. finden sich Furanocumarine auch u.a. in *Petroselinum crispum*, *Apium graveolens*, *Heracleum mantegazzianum* (Riesenbärenklau) sowie *Angelica archangelica* (Engelwurz).

Furanocumarine kommen in allen ober- und unterirdischen Geweben der Pflanzen in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Da die toxischen Furanocumarine der Pflanze zur Abwehr dienen, wird der größte Teil aus den Zellen auf die Blattoberfläche ausgeschieden (Tietjen *et al.*, 1983). Auch auf den Früchten, in denen die Konzentration am höchsten ist (Lohman & McConnaughay, 1998), werden Furanocumarine abgelagert (Zobel & March, 1993).

Unter den Rutaceae sind vor allem die Gattungen *Ruta* und *Citrus* hinsichtlich ihres Vorkommens an Furanocumarinen hervorzuheben. Besonders *Ruta graveolens* (Weinraute) stellt eine vielversprechende Quelle für die Isolierung von linearen Furanocumarinen dar (Milesi *et al.*, 2001). Eine weitere wichtige Quelle ist das Bergamottöl aus der vor allem in Kalabrien (Italien) beheimateten *Citrus bergamia*.

Auch bei den Moraceae (Maulbeergewächsen) finden sich Furanocumarine, v.a. in den Gattungen *Ficus* und *Dorstenia* (Franke *et al.*, 2001). Dessen Vertreter stammen hauptsächlich aus den Tropen. Außerdem sind Furanocumarine aus zwei Gattungen der Fabaceae, *Psoralea* und *Coronilla* (Pathak *et al.*, 1962) beschrieben worden, wobei ausschließlich Psoralen, in manchen Arten auch Angelicin gebildet wird.

A.2.2 Struktur

Die Grundstruktur aller Cumarine ist das 2-H-1-benzopyran-2-on (**Abb. 3a**).

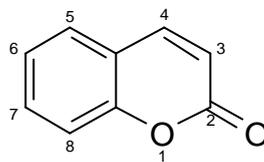
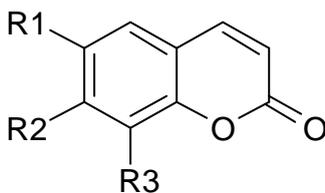


Abbildung 3a: Cumarin-Grundstruktur

Zu den einfachen Cumarinen zählt das Cumarin selbst und seine hydroxylierten, alkoxylierten und alkylierten Derivate (**Abb. 3b**).



Umbelliferon: $R_1 = R_3 = H; R_2 = OH$

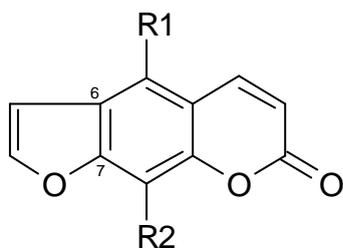
Esculetin: $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$

Scopoletin: $R_1 = OCH_3; R_2 = OH; R_3 = H$

Abbildung 3b: Substituierte Cumarine

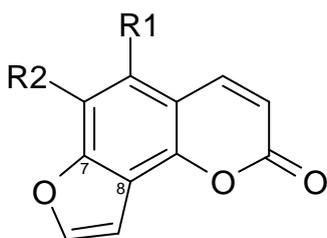
Die Furanocumarine stellen trizyklische Ringsysteme dar, bei denen ein Furanring mit Cumarin verknüpft ist. Das Psoralen als Grundstruktur der linearen Furanocumarine zeigt eine lineare Verknüpfung an 6,7-Position. (**Abb. 4**). Die angulären Furanocumarine mit dem Angelicin als Grundstruktur besitzen einen in 7,8-Position mit dem Cumarinsystem verknüpften Furanring.

Die Furanocumarine sind in der Regel kristalline Verbindungen, die sich in Wasser schlecht und in organischen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität gut lösen (z.B. Ethanol, Aceton, Methoxyethanol). Sie sind auch bei hohen Temperaturen chemisch stabil. Lipophile Vertreter sind oft wasserdampfflüchtig, so dass sie charakteristische Inhaltsstoffe einiger ätherischer Öle sind.



Psoralen-Typ

Psoralen:	$R_1 = R_2 = H$
Bergaptol:	$R_1 = OH; R_2 = H$
Bergapten:	$R_1 = OCH_3; R_2 = H$
Xanthotoxol:	$R_1 = H; R_2 = OH$
Xanthotoxin:	$R_1 = H; R_2 = OCH_3$
Isopimpinellin:	$R_1 = R_2 = OCH_3$



Angelicin-Typ

Angelicin:	$R_1 = R_2 = H$
Pimpinellin:	$R_1 = R_2 = OCH_3$

Abbildung 4: Substitutionsmuster der linearen und angulären Furanocumarine

A.2.3 Wirkung von linearen Furanocumarinen

Bereits zu Beginn der fünfziger Jahre des vorherigen Jahrhunderts wurden lineare Furanocumarine mit komplexen Substituenten auf ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht und die unsubstituierte, lineare und planare Furanocumarin-Grundstruktur als essentiell für die hohe photosensibilisierende und phototoxische Wirkung bewertet (Murray *et al.*, 1982). Komplexe von Furanocumarinen mit menschlichem Serum-Albumin, Rinderserumalbumin (BSA) oder Lysozym, sowie Bindungen an verschiedene Ribonukleinsäuren (tRNA; rRNA), sind beschrieben, allerdings nicht intensiver untersucht (Murray *et al.*, 1982).

Sehr genau wurde dagegen die phototoxische Aktivität der Furanocumarine studiert. Diese beruht auf der Fähigkeit, an Desoxyribonukleinsäuren (DNA) zu binden. Die 5,6-Doppelbindung der Pyrimidinbasen konjugiert unter Ausbildung von C₄-Zykloaddukten mit den 3,4- und 2',3'-Doppelbindungen der linearen Furanocumarine (Murray *et al.*, 1982). Die Helixstruktur der DNA ist für die Adduktbildung essentiell, und Hitzedenaturierung der DNA führt zum Verlust der Bindekapazität. Veränderungen der Helixstruktur nach Bindung an lineare Furanocumarine sind beschrieben (Eichman *et al.*, 2001).

Es wird vermutet, dass durch UV-Bestrahlung die Elektronen des Psoralens und von dessen methoxylierten Derivaten, jedoch nicht von hydroxylierten Derivaten wie z.B. Bergaptol, in den Singulettzustand (hochreaktiver Zustand) versetzt werden. Dieser bleibt so lange stabil, dass das Furanocumarin kovalent an die DNA binden kann (Murray *et al.*, 1982). Da die 3,4-Doppelbindung reaktiver als die 2', 3'-Doppelbindung ist, entstehen hauptsächlich 3,4-Monoaddukte. Diese absorbieren keine UV-Strahlung und können im Gegensatz zu den 2',3'-Photoaddukten nicht zu Diaddukten weiterreagieren (Dall'Acqua *et al.*, 1979). Nur aus 2',3'-Monoaddukten entstehen bei weiterer Bestrahlung, durch die Reaktion der 3,4-Doppelbindung des Furanocumarins mit einer Pyrimidin-Base des Gegenstranges, Diaddukte.

Im Gegensatz zu den Diaddukten kann die durch Monoaddukte geschädigte DNA von zelleigenen Reparatursystemen schnell wiederhergestellt werden. Es kommt somit nur zu einer geringen Verminderung der DNA-Replikation, biologische Konsequenzen wie Zelltod oder Cancerogenität (Murray *et al.*, 1982) treten nicht auf. Die photosensitive Wirkung beruht sowohl auf den reversiblen Monoaddukten als auch auf den die DNA quervernetzenden irreversiblen Diaddukten (Cole, 1971).

Als biochemische Konsequenz der Bindung der linearen Furanocumarine an Nukleinsäuren kommt es zum falschen Einbau von Nukleinsäuren oder auch zur völligen

Hemmung der DNA-Replikation bzw. RNA-Polymerase-Reaktion und Proteinbiosynthese. Der photobiologischen Wirkung wurden daher auch bereits mutagene und kanzerogene Wirkungen zugeschrieben (Cassier *et al.*, 1984). Aufgrund dieser Phototoxizität wurden die Furanocumarine hinsichtlich ihrer Verbreitung und physiologischen Wirkung untersucht. So konnten nach der Ernte von *A. graveolens* L. bei Erntearbeitern wiederholt Photosensibilisierungen in Form von lokalen Rötungen, Schwellungen und Bläschenbildung beobachtet werden, für die Xanthotoxin als Ursache ermittelt wurde (Finkelstein *et al.*, 1994). Eine neu gezüchtete Sellerie-Variante mit Resistenz gegenüber verschiedenen Schädlingen zeigt eine noch stärkere photosensibilisierende Wirkung (Beier, 1990). Bei Floristen wurde die Ausbildung einer Immunglobulin-vermittelten allergischen Rhinitis durch *A. majus* beschrieben (Kiistala *et al.*, 1999).

Bestimmte DNA-Viren zeigen eine durch die Adduktbildung hervorgerufene verminderte Aufnahme in Wirtszellen und RNA-Viren einen Verlust an Infektiosität (Murray *et al.*, 1982). Auch eine Hemmung von schnell proliferierenden Zellen wie z.B. Tumorzellen konnte belegt werden (Bordin *et al.*, 1975).

Ein Effekt linearer Furanocumarine auf Enzymaktivitäten wurde sowohl mit als auch ohne UV-Bestrahlung beschrieben. Xanthotoxin hemmt die humane Cytochrom P450 2A6-Monooxygenase in menschlichen Leberzellen (Maenpaa *et al.*, 1994; Koenigs & Trager, 1998), die für die Metabolisierung einer Vielzahl toxischer Komponenten wie Aflatoxinen oder Nitroverbindungen des Zigarettenrauches verantwortlich ist. Bergamottin und Bergapten, beide in frischem Grapefruitsaft enthalten, beeinflussen durch Induktion bzw. Hemmung von Cytochrom P450 die Bioverfügbarkeit und Metabolisierung gleichzeitig verabreichter Arzneistoffe (He *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2000; Sahi *et al.*, 2002; Mohri *et al.*, 2000). In elicitor-behandelten Zellkulturen von *A. majus* wurde die Hemmung eines Enzyms der Phytosterolbiosynthese durch Furanocumarine beschrieben (Fulton *et al.*, 1993).

Lichtunabhängig sind die toxischen Effekte der linearen Furanocumarine, die nicht zuletzt durch Verluste in der Tierhaltung durch Fütterung von Pflanzen oder Samen (Dollahite *et al.*, 1978; Egyed *et al.*, 1974) nachgewiesen wurden. Dieser toxische Effekt der Furanocumarine wurde zunächst für Guppies und später auch für Meerschweinchen beschrieben (Murray *et al.*, 1982). Die antimikrobielle Wirkung der Furanocumarine, die zu ihrer Klassifizierung als Phytoalexine geführt hat, wurde ebenfalls lichtunabhängig für verschiedene Organismen beschrieben (Murray *et al.*, 1982). (+)-Marmesin, das stärker antimykotisch wirksam ist als Psoralen (Afek *et al.*, 2002), dient als Beleg der Lichtunabhängigkeit, da es aufgrund fehlender 2',3'-Doppelbindung keine UV-Licht vermittelte Quervernetzung von DNA aufweisen kann.

A.2.4 Medizinische Anwendung der Furanocumarine

Psoralene werden zur photochemotherapeutischen Behandlung von Hauterkrankungen eingesetzt. In Ägypten wurden bereits um 2000 v. Chr. Furanocumarin-haltige Pflanzen in Kombination mit Sonnenlicht zur Hautpigmentstimulierung verwendet (Pathak & Fitzpatrick, 1992). 1947 konnte Xanthotoxin aus *Ammi majus* isoliert werden (Schönberg & Sina, 1948); 1948 wurde das gereinigte Xanthotoxin erstmals zur Behandlung von Vitiligo in klinischen Studien eingesetzt (El Mofty, 1948; Bethea *et al.*, 1999). Vitiligo ist eine Pigmentanomalie der Haut, bei der die Pigmentzellen degenerieren. Durch Behandlung mittels PUVA-Therapie (**P**soralen und **U**VA-Strahlung) kommt es durch Neubildung von Melanin zu einer verstärkten Pigmentierung der behandelten Haut (Sahin *et al.*, 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass Psoralene die Replikation von DNA durch „cross-linking“ des DNA-Doppelstranges inhibieren (Baden *et al.*, 1972). In Form der PUVA-Therapie wird dieses Wirkprinzip seit 1974 bei Hauterkrankungen mit pathologisch erhöhter Zellteilung wie Psoriasis medizinisch angewendet (Pathak *et al.*, 1981). Die Psoralene, die als Lichtsensibilisatoren systemisch oder lokal appliziert werden, interkalieren zunächst nicht-kovalent zwischen den Basenpaaren des DNA-Doppelstranges. Unter Bestrahlung mit UVA-Licht (320-410 nm) konjugieren die 3,4- und 2',3'-Doppelbindungen mit Pyrimidinresten zu Mono- oder Diaddukten (Isaacs *et al.*, 1977) (**Abb. 5**). Die Replikation der DNA wird gehemmt, und die pathologisch erhöhte Zellteilung nimmt ab. Die Bestrahlung mit UVB-Licht hat sich inzwischen als ebenso effektiv erwiesen (El Mofty *et al.*, 2001). Aufgrund der geringeren Datenlage über Langzeiteffekte zu UVB wird weiterhin UVA eingesetzt.

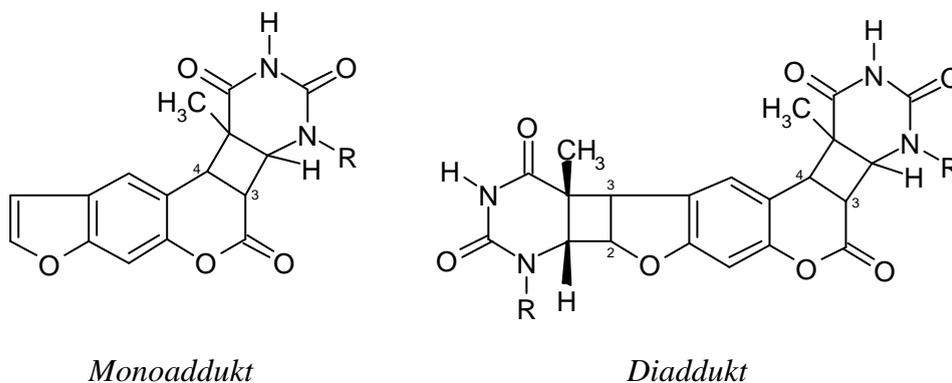


Abbildung 5: Monoaddukt und Diaddukt von Psoralen und Pyrimidinbasen

Beim Monoaddukt ist die 3,4-Doppelbindung des Furanocumarins mit einem Pyrimidinrest, beim Diaddukt zusätzlich die 2',3'-Doppelbindung mit einer zweiten Pyrimidin-Base konjugiert.

Nebenwirkungen sind phototoxische Reaktionen wie Erytheme und Bläschenbildung. Auch mutagene und kanzerogene Wirkungen werden den Psoralen-DNA-Addukten zugeschrieben (Cassier *et al.*, 1984). Für die PUVA-Therapie werden hauptsächlich die Photosensibilisatoren Bergapten und Xanthotoxin angewendet, wobei Bergapten eine effektivere Wirkung und geringere gastrointestinale Nebenwirkungen und Hautentzündungen zugeschrieben wurden (Honigsmann *et al.*, 1979; Hann *et al.*, 1991; McNeely & Goa, 1998).

Bergapten und Xanthotoxin blockieren selektiv im Axolemma vorkommende spannungsabhängige Kaliumkanäle (Bohuslavizki *et al.*, 1994). Es wird vermutet, dass die Alkoxy-psoralene mit der spannungsabhängigen Signaltransduktion in Lymphozyten interferieren und dadurch Immunantworten bei Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems und anderer Autoimmunerkrankungen unterdrücken (Strauss *et al.*, 2000). Durch eine Blockierung der Kaliumkanäle könnten so Erkrankungen wie z.B. Multiple Sklerose (MS), die mit einer Demyelinisierung von Nerven verbunden sind, symptomatisch therapiert werden (During *et al.*, 2000).

Furanocumarine weisen weitere Effekte von medizinischem Wert auf, die die Forschung in diesem Bereich rechtfertigen. So wurden Furanocumarinderivate beschrieben, die anti-HIV-Aktivität besitzen und die Freisetzung von Zytokinen hemmen (Zhou *et al.*, 2000). Andere Furanocumarine weisen antibakterielle Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* auf (Tada *et al.*, 2002). Verschiedene *Apium*-Spezies zeigen eine durch lineare Furanocumarine vermittelte antimikrobielle Aktivität gegenüber *Liriomyza trifolii* (Trumble *et al.*, 1990). Eine Hemmung der für die DNA-Replikation notwendige DNA-Gyrase aus *E. coli* (Yorgey *et al.*, 1994) konnte in diesem Zusammenhang ebenfalls belegt werden. Verbindungen, die antiinflammatorisch (Silvan *et al.*, 1996), Lipoxygenase-hemmend (Huang *et al.*, 1993) sowie stark tumorhemmend wirken (Mizuno *et al.*, 1994), wurden pharmakologisch untersucht.

A.2.5 Furanocumarine als Phytoalexine

A.2.5.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen

In ihrer natürlichen Umgebung sind Pflanzen einer Vielzahl von potentiellen Pflanzenschädlingen wie Bakterien, Pilzen und Viren ausgesetzt. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen eine Reihe von präformierten und induzierbaren Abwehrmechanismen (Sequera, 1983) aufgebaut, die ihnen ein wirksames Resistenzpotential verleihen und so ihr Überleben in der Natur ermöglichen.

Zu den präformierten Abwehrmechanismen zählen vor allem konstitutive physikalische Barrieren. Hierzu gehören die verschiedenen Zellwandkomponenten Lignin, Suberin und Cellulose und die Cuticula und Wachsschichten auf den Blättern.

Einer Infektion mit pathogenen Mikroorganismen begegnen Pflanzen vor allem mit einem komplexen Muster induzierbarer Abwehrmechanismen. Modifikationen der Zellwand mit der Einlagerung von Lignin und anderen phenolischen Verbindungen (Tannine, Suberosine) sowie Kallose-Auflagerungen (Hahlbrock *et al.*, 1995) wirken als strukturelle Barrieren bei der Besiedlung der Pflanze durch das Pathogen. Eine erhöhte Produktion von lytischen Enzymen wie Chitinasen und β -1,3-Glucanasen (Schröder *et al.*, 1992) ermöglicht den Abbau pilzlicher Zellwandbestandteile.

Ein weit verbreiteter Mechanismus der induzierten pflanzlichen Abwehr gegen pilzliche Parasiten beruht auf der Bildung antimikrobiell wirksamer Substanzen, den Phytoalexinen (Bailey & Mansfield, 1982). Diese sind definiert als niedermolekulare Verbindungen, die nach Pathogenbefall in den Pflanzen synthetisiert und akkumuliert werden (Paxton, 1982). Phytoalexine gehören verschiedenen Substanzklassen des sekundären Pflanzenstoffwechsels an, wobei in der Regel eine Naturstoffgruppe für eine Pflanzenfamilie charakteristisch ist (Bailey & Mansfield, 1982). So bilden die Pinaceae im allgemeinen Flavanone und Stilbenoide (Hanawa *et al.*, 2001), die Brassicaceae Mono- und Dithiocarbamate (Pedras *et al.*, 2000; Pedras *et al.*, 2003), die Asteraceae Sesquiterpenlactone (Sessa *et al.*, 2000; Bouwmeester *et al.*, 2002) und die Fabaceae Isoflavonoide (Ebel *et al.*, 1984; Grab *et al.*, 1985; Bednarek *et al.*, 2003).

Nach Infektion akkumulieren die Phytoalexine in und an der Infektionsstelle. Häufig wird diese Akkumulierung von einer hypersensitiven Reaktion (hypertensive response, HR) begleitet. Sie soll das Wachstum und die Ausbreitung des Pathogens verhindern und führt unter Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu Nekrose und Absterben des infizierten

Gewebes. Gleichzeitig werden die Zellwände benachbarter Zellen durch gesteigerte Synthese von Zellwandpolymeren verstärkt, um eine weitere Penetration der Parasiten ins Gewebe zu verhindern (Bailey & Mansfield, 1982; Hahlbrock *et al.*, 1995).

In vereinfachter Form können induzierte Schutzmechanismen einer Pflanze in einem Zellkultursystem ausgelöst werden. Die Induktion der Phytoalexinsynthese erfolgt durch Signalmoleküle, sogenannte Elicitoren. Diese können abiotischen oder biotischen Ursprungs sein. Als abiotische Elicitoren werden u.a. Schwermetallsalze (Pedras *et al.*, 2003), Säuren und Säuredämpfe (Dercks *et al.*, 1990; Kauss *et al.*, 1993), Ozon (Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1994), Wasserstoffperoxid, Röntgenstrahlung (Kitamura *et al.*, 2002), Kältebehandlung, Hitze und UV-Bestrahlung eingesetzt (Scheel *et al.*, 1987). Zu den biotischen Elicitoren gehören Substanzen, die aus Zellwänden von Pilzen oder Pflanzen gewonnen werden. Auch das Pflanzenhormon Jasmonsäure stellt einen biotischen Elicitor dar (Stanjek *et al.*, 1997a).

Zellsuspensionskulturen aus *P. crispum* (Tietjen *et al.*, 1983; Wendorff & Matern, 1986) und *A. majus* (Hamerski & Matern, 1988a,b) sind als Modellsysteme für Apiaceen zur induzierten pflanzlichen Pathogenabwehr beschrieben. Beispielsweise wirkt bei dem Pilz *Phytophthora sojae* (vormals *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, Pmg) in *P. crispum* ein Peptid aus der Zellwand des Elicitors und induziert die Furanocumarinbildung (Nürnberger *et al.*, 1994; Sacks *et al.*, 1995). Eine Region von 13 Aminosäuren im Bereich des C-Terminus des 42 kDa Glykoproteins ist dabei ausreichend, um die komplette Pflanzenabwehr zu stimulieren. Die Induktion von Sojazellen wird durch Glucane hervorgerufen (Sharp *et al.*, 1984). Genaue Untersuchungen der als Elicitor wirksamen Strukturen sind im Blickpunkt der Forschung (Qutob *et al.*, 2003).

A.2.5.2 Modellsystem *Phytophthora sojae* auf *Petroselinum crispum* – Intrazelluläre Signal-Transduktion

P. crispum L. Zellkulturen synthetisieren nach Infektion mit *Phytophthora sojae* Psoralen-Phytoalexine, die sich von der 4-Cumarsäure ableiten.

Zunächst dringt der Pilz über Hyphen in die Zellen ein. Allein diese mechanische Interaktion führt zur Induktion verschiedener Reaktionen wie der Aktivierung von Abwehrgenen und der Wanderung von Zellkern und Zytoplasma in Richtung des physikalischen Kontaktes (Gus-Mayer *et al.*, 1998). Gleichzeitig bindet der Peptid-Elicitor hochspezifisch an bestimmte Bindestellen (Nürnberger *et al.*, 1994) (**Abb. 6**), die in mikrosomalen Membranfraktionen und Protoplasten der Petersilie entdeckt wurden. Nach der

Bindung des Elicitors kommt es zur Aktivierung eines Ionenkanals im Plasmalemma und einem dadurch erhöhten cytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegel und sinkenden Konzentrationen an K^+ und Cl^- Ionen. Außerdem treten zwei weitere Plasmamembran-assoziierte und vom Ca^{2+} -Ionen-Einstrom abhängige Ereignisse auf: Die Bildung von ROS (Lamb & Dixon, 1997) und Jasmonsäure (Nürnberger *et al.*, 1994; Kroj *et al.*, 2003). Neben direkten antimikrobiellen Effekten dient der massive und transiente Anstieg der ROS als Signal zur Aktivierung von Abwehrgenen und ist somit ein essentielles Element der Signalkaskade zur Phytoalexin-Produktion (Jabs *et al.*, 1997). Über den erhöhten Ca^{2+} -Spiegel führt ein zweiter Signaltransduktionsweg zu Phosphorylierungen verschiedener Proteine *in vivo* und einem starken Anstieg der Expression von PR-Genen (pathogenesis related) (Hahlbrock *et al.*, 2003). Die intrazelluläre Signalweiterleitung über Phosphorylierungen von Proteinen erfolgt durch Proteinkinasen (Cardinale *et al.*, 2000), zu denen die Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CDPKs; Allwood *et al.*, 2002) und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs; Ligterink *et al.*, 1997) gehören. Der Jasmonatweg ist die dritte durch den Peptid-Elicitor stimulierte Kaskade und noch nicht weiter erforscht.

Über Signalkaskaden erfolgt eine sofortige Transkription der an der Abwehr beteiligten Gene (Hahlbrock *et al.*, 1995).

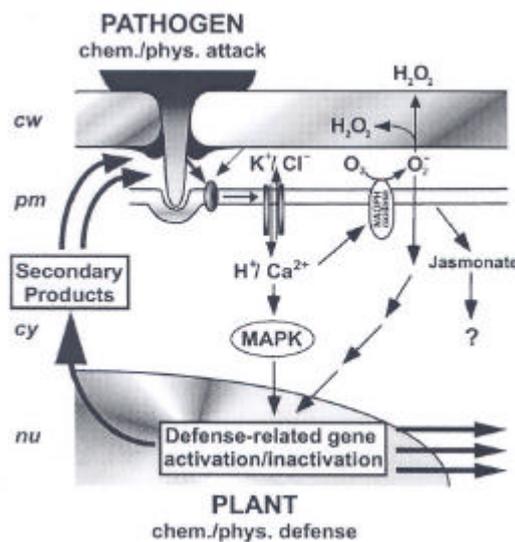


Abbildung 6: Schema der elicitor-induzierten Signaltransduktion in *Petroselinum crispum* (Hahlbrock *et al.*, 2003)

Zu den Genen, deren Transkription nach Induktion in *P. crispum*-Zellkulturen aktiviert werden, gehören u.a. die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) und die 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL). Diese drei Enzyme katalysieren den allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel und werden sowohl durch UV-Bestrahlung als auch durch pilzliche Elicitoren (*Pmg*) stimuliert (Hahlbrock *et al.*, 1981). Auf der Stufe der Transkription und auch der Translation ist die Regulation von PAL, C4H und 4CL streng koordiniert (Reinold & Hahlbrock, 1996). Vier Gene kodieren die PAL und zwei die 4CL (Logemann *et al.*, 1995), dagegen nur ein Gen die C4H in *P. crispum* (Koopmann *et al.*, 1999). Die Aktivierung der Genexpression der spezifischen Enzyme der Furanocumarinbiosynthese, die letztendlich zu den Phytoalexinen führen (Tietjen *et al.*, 1983; Hauffe *et al.*, 1986; Hamerski *et al.*, 1989), erfolgt im späteren Verlauf der Induktion (Hauffe *et al.*, 1986) und nur durch pilzliche Elicitoren. Eine UV-Bestrahlung erzielt nur sehr geringe Effekte (Lozoya *et al.*, 1991).

A.2.6 Furanocumarine in der Interaktion mit Insekten

In der Natur dienen Furanocumarine der Pflanze als Fraßschutz vor Vieh und Insekten. Trotz der Toxizität der Furanocumarine haben sich manche Insekten auf furanocumarinhaltige Pflanzen der Apiaceae und Rutaceae spezialisiert (Berenbaum, 2002). Diese Anpassung wurde erstmals bei den Larven des Schmetterlings *Papilio polyxenes* (schwarzer Schwalbenschwanz) beobachtet (Berenbaum, 1981). Insgesamt sind ungefähr 75 % dieser Gattung mit solchen Pflanzen assoziiert (Berenbaum, 2002), wobei *Papilio polyxenes* auf furanocumarinhaltige Pflanzen spezialisiert ist.

Die Detoxifizierung der Furanocumarine wird durch Cyt P450 der CYP6B-Genfamilie vermittelt (Ma *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000). Sie wurden bereits kloniert und untersucht (Chen *et al.*, 2002). Diese Art des Abbaus besitzen der auf Rutaceae spezialisierte *P. cresphontes* sowie die auf Apiaceae ausgerichteten *P. polyxenes* und *P. brevicauda*. Spezies, die keine Spezialisierung auf furanocumarinhaltige Familien als Nahrungspflanzen zeigen, können Furanocumarine nicht durch Cyt P450 vermittelt abbauen (Cohen *et al.*, 1992). Bei Untersuchungen der einzelnen Entwicklungsstadien konnte eine Expression der CYP6B nur in den Larven festgestellt werden. Keine CYP-Aktivität wurde in den Eiern, Puppen oder ausgewachsenen Schmetterlingen gefunden (Harrison *et al.*, 2001). Die Effizienz der Metabolisierung hängt stark von den Substituenten der Furanocumarine ab, methoxylierte Derivate werden am besten abgebaut (Ma *et al.*, 1994). Anguläre Furanocumarine werden

dagegen kaum metabolisiert. Sie können aber durch Bindung an dieselben P450-Enzyme den Abbau der linearen Furanocumarine behindern.

Neben den Cyt P450, die Furanocumarine abbauen, besitzen manche Insekten auch Cyt P450, die durch Furanocumarine (speziell Xanthotoxin) induziert werden. Scheinbar vermitteln die induzierten Enzyme den Abbau von Insektiziden und führen so zu einer erhöhten Toleranz diesen gegenüber (Li *et al.*, 2000). Alle bisher bekannten *Papilio*-Cyt P450 weisen einen hochkonservierten Sequenzbereich auf, der der Erkennung von Xanthotoxin als Induktor dient (Prapaipong *et al.*, 1994).

Auch Furanocumarine von *Tetradium daniellii* aus der Familie der Rutaceae (Stevenson *et al.*, 2003) dienen dem Fraßschutz, insbesondere gegenüber Larven von *Spodoptera littoralis* und *Heliothis virescens*. Letzterem wurde die Fähigkeit zugeschrieben, Xanthotoxin zu metabolisieren und zu detoxifizieren (Green *et al.*, 2001). *Helicoverpa zea*, der Maisohrwurm, frisst nur vereinzelt furanocumarinhaltige Pflanzen. Dennoch besitzt er wie die Vertreter der Gattung *Papilio* Cytochrome der Subfamilie CYP6B zur Detoxifizierung von Furanocumarinen (Li *et al.*, 2000).

A.3 Biosyntheseweg von linearen Furanocumarinen

A.3.1 Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel

Der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel stellt den Ausgangspunkt einer Vielzahl von pflanzlichen Sekundärstoffen dar. L-Phenylalanin (**Abb. 7**) ist u.a. die Vorstufe für Hydroxyzimtsäure bzw. Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester (Murray *et al.*, 1982). Die PAL katalysiert die Bildung von *trans*-Zimtsäure, die anschließend durch die C4H, einer Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase, zur 4-Cumarsäure hydroxyliert wird. Diese wurde als erstes aus *Helianthus tuberosus* (Pierrel *et al.*, 1994) und später auch aus anderen Pflanzenspezies, u. a. aus *A. majus* (Hübner *et al.*, 2003) isoliert. Die Aktivierung der 4-Cumarsäure zum 4-Cumaroyl-CoA katalysiert die 4CL. Aktivierte Zimtsäuren sind Substrate für zahlreiche Stoffwechselwege wie z. B. die Lignin-, Flavonoid- und Cumarinbiosynthese (Hamerski, 1989). Daher stellt die 4-Cumarsäure eine Schlüsselverbindung dieser Stoffwechselwege dar.

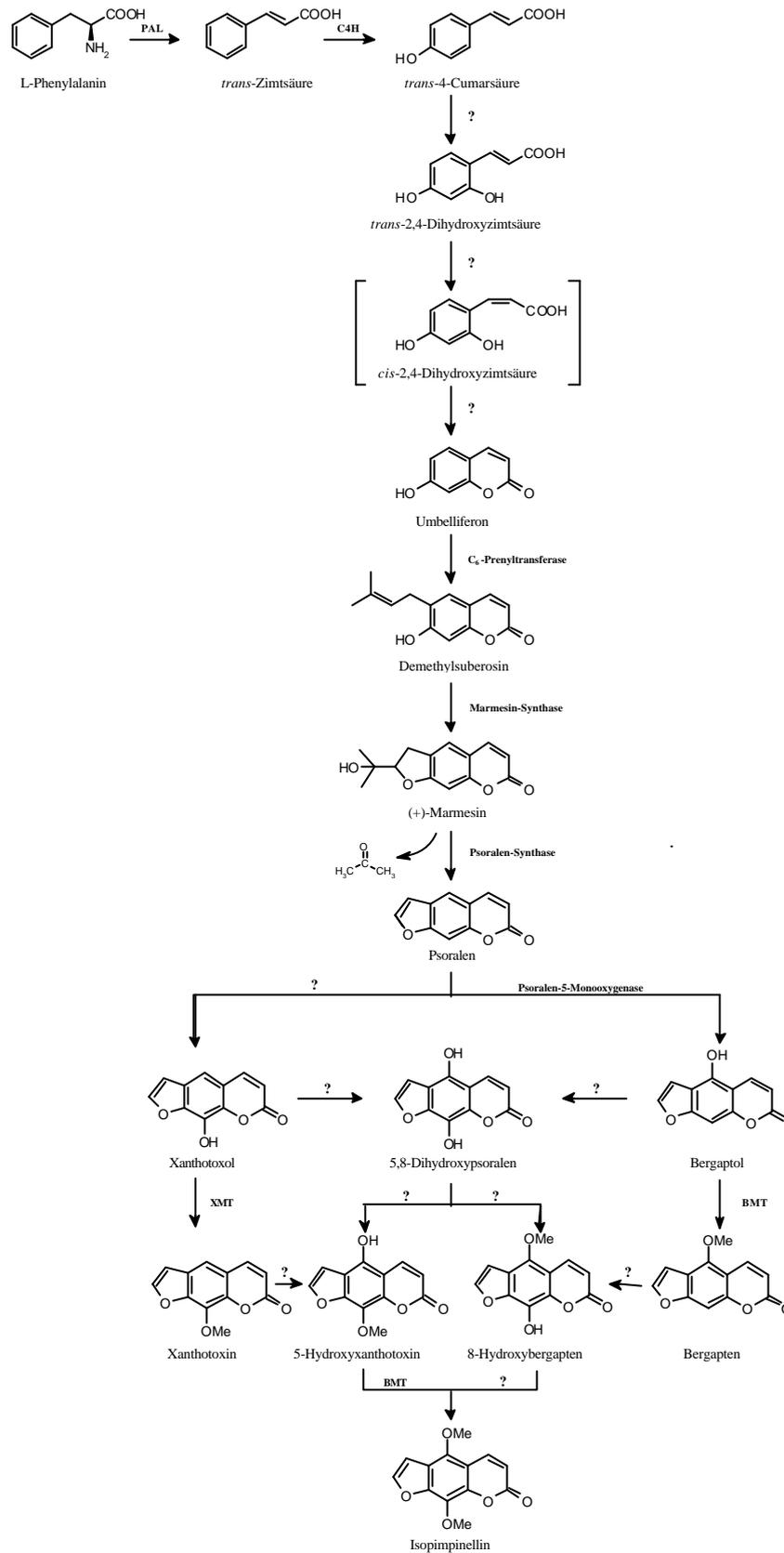


Abbildung 7: Biosyntheschema der linearen Furanocumarine

PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; **C4H:** Zimtsäure-4-Hydroxylase; **C₆-Prenyltransferase:** Dimethylallyl-diphosphat:Umbelliferon 6-Dimethylallyltransferase; **BMT:** S-Adenosyl-L-methionin:Bergapitol O-Methyltransferase; **XMT:** S-Adenosyl-L-methionin:Xanthotoxol O-Methyltransferase. Die **Marmesin-Synthase** und **Psoralen-Synthase** wurden mit Trivialnamen bezeichnet. Es handelt sich um Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen.

A.3.2 Biosynthese des Umbelliferons

Bis heute ist die genaue Biosynthese des Umbelliferons nicht abschließend geklärt. Durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierter *trans*-Zimtsäure zeigte Brown (1960), dass diese die Vorstufe für alle Cumarine ist. Die 7-Hydroxylierung des Umbelliferons dagegen ist durch die 4-Cumarsäure festgelegt (Murray, 1982). Es sind zwei Mechanismen für die Synthese des Umbelliferons denkbar, wobei der erste (**Abb. 8a**) über eine *ortho*-Hydroxylierung der Zimtsäure (Gestetner & Conn, 1974; Ranjeva *et al.*, 1977) bzw. der 4-Cumarsäure (Kindl, 1977) beschrieben ist. Diese *ortho*-Hydroxylierung wurde u.a. aus Chloroplastenfraktionen von *Melilotus alba* (Gestetner & Conn, 1974) postuliert, konnte aber nicht bestätigt werden. Im Anschluss ist eine *trans-cis*-Isomerisierung erforderlich, die leicht unter Belichtung erfolgt (Edwards & Stoker, 1967). Eine Isomerase wurde für diese Reaktion ebenfalls vorgeschlagen (Stoker, 1964). Die abschließende Lactonisierung zum Umbelliferon würde spontan oder auch enzymkatalysiert erfolgen. Als zweiter Mechanismus (**Abb. 8b**) ist auch ein direkter Ringschluss der 4-Cumarsäure über ein Quinol bzw. eine Spirodien-Zwischenstufe denkbar (Grisebach & Ollis, 1961; Matern, 1991).

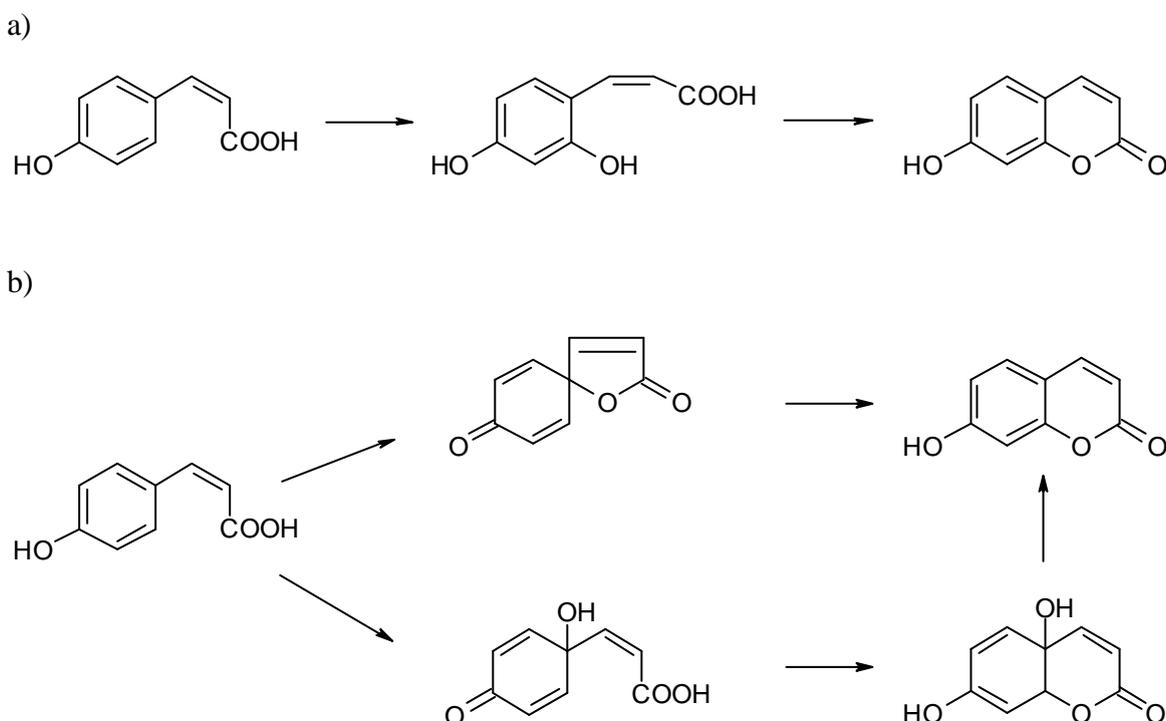


Abbildung 8: Vorgeschlagene Wege der Umbelliferon-Biosynthese

(Übersicht aus Grisebach & Ollis, 1961; Matern, 1991)

A.3.3 Prenylierung von Umbelliferon

Lineare Furanocumarine erfordern die C₆-Prenylierung des Umbelliferons mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) zu Demethylsuberosin (Murray *et al.*, 1982) (**Abb. 7**). Diese Reaktion wurde erstmalig *in vitro* mit Chloroplasten aus *R. graveolens* (Dhillon & Brown, 1976) nachgewiesen und später in Mikrosomen von elicitor-behandelten Zellkulturen aus *P. crispum* und *A. majus* (Tietjen & Matern, 1983; Hamerski *et al.*, 1990b) bestätigt. Das Enzym aus *P. crispum* ist Mn²⁺-abhängig, wohingegen Mg²⁺ bei der Prenylierung mit *A. majus* die besten Ergebnisse lieferte. Durch Isotopenmarkierung der Psoralene *in vivo* konnte in *A. graveolens* gezeigt werden, dass das DMAPP für diesen Schritt nicht aus dem cytosolischen Mevalonat-Weg stammt. Es leitet sich von der 1-Deoxy-D-xylulose (DOX) ab und wird in den Plastiden über einen Mevalonat unabhängigen Weg gebildet (Stanjek *et al.*, 1999a).

Mikrosomen aus induzierten *A. majus* Zellkulturen katalysieren eine zweite Prenylierungsreaktion mit hoher Aktivität zum 7-O-Prenylumbelliferon. Diese Prenylierung erfordert die Gegenwart von Mn²⁺-Ionen (Hamerski *et al.*, 1990b). Es entstehen die labilen Butenyl- (Cumarin A) und Butadienylether (Cumarin B) des Umbelliferons.

Analog würde die Prenylierung des Umbelliferons in C₈-Position zu Osthonol führen als Vorstufe der angulären Furanocumarine. Die entsprechende Prenyltransferase fehlt in *A. majus*, da hier nur lineare Furanocumarine (Psoralene) akkumulieren. Sie ist aber auch aus anderen Pflanzen bisher nicht beschrieben worden; das Enzym müsste ebenfalls membranassoziiert vorliegen (Matern *et al.*, 1999).

A.3.4 Marmesin und Psoralen

Demethylsuberosin wird durch mehrere Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen zu den Psoralenen umgesetzt. Zunächst wird das Demethylsuberosin zum (+)-Marmesin zyklisiert (Matern *et al.*, 1999). In Gegenwart von NADPH und Sauerstoff konnte *in vitro* die Zyklisierung in mikrosomalen Fraktionen aus induzierten Pflanzenzellen von *A. majus* und *P. crispum* erreicht werden (Hamerski & Matern, 1988a; Matern *et al.*, 1988; Wendorff & Matern, 1986). Der Reaktionsmechanismus wird nach Brown *et al.* (1970) wie folgt vorgeschlagen: Im ersten Schritt erfolgt eine Epoxidierung der Doppelbindung des Prenylrestes. Unter oxidativer Öffnung des Epoxids wird ein Diol gebildet, welches in einer

S_N2 -Reaktion unter Inversion der Konfiguration zum (+)-Marmesin verethert wird (**Abb. 9**). Eine Bestätigung dieser Reaktionsfolge steht noch aus.

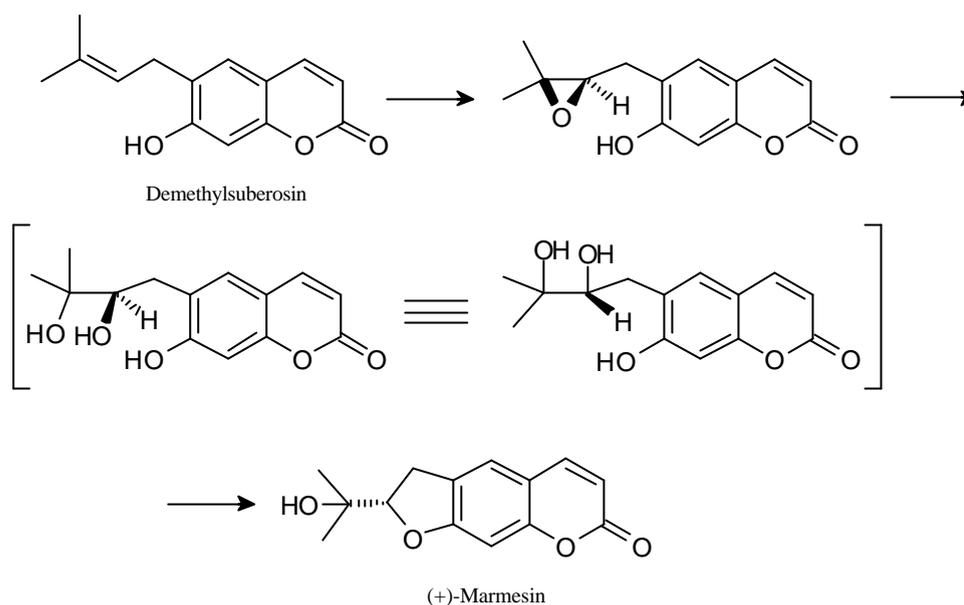


Abbildung 9: Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die Marmesin-Synthese

Es wird postuliert (Brown *et al.*, 1970), dass bei der Reaktion intermediär eine Epoxidierung der Prenyl-Doppelbindung mit anschließender Hydrolyse zum Diol und Zyklisierung stattfindet.

Die Umsetzung des (+)-Marmesin zu Psoralen durch die Psoralen-Synthase verläuft mit Spaltung einer C-C-Bindung. Dieser Schritt liefert Psoralen als Vorstufe für die weiteren Mitglieder der Psoralenfamilie (Hauffe *et al.*, 1986). Die Psoralen-Synthase wurde erstmals in elicitor-induzierten Zellkulturen aus *P. crispum* (Wendorff & Matern, 1986) und später auch aus *A. majus* (Hamerski, 1989) als membrangebundene Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase charakterisiert. Mit Hilfe spezifischer Inhibitoren konnte die Psoralen-Synthase als separates Enzym von der Marmesin-Synthase abgegrenzt werden (Matern, 1991). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der engen Spezifität von pflanzlichen Cyt P450 in anderen Systemen (Bolwell *et al.*, 1994; Chapple, 1998). Die Umsetzung des (+)-Marmesin zum Psoralen ist abhängig von NADPH und Sauerstoff und erfolgt formal unter Abspaltung eines C_3 -Fragmentes (Aceton) und Oxidation des Dihydrofurans in das Furanocumarin (Murray *et al.*, 1982). Aus dem Steroidstoffwechsel sind diese Cytochrom P450-katalysierten oxidativen Bindungsspaltungen als mehrstufige Prozesse mit schrittweiser Oxidation und Entfernung einzelner Methylgruppen bekannt (Halkier, 1996).

Mikrosomen aus induzierten Zellkulturen von *A. majus* setzten jedoch spezifisch deuteriertes Marmesin in einer konzertierten Reaktion zu äquimolaren Mengen an Psoralen und deuteriertem Aceton um (**Abb. 10**) (Stanjek *et al.*, 1997b; Stanjek *et al.*, 1999b). Es konnte gezeigt werden, dass der Prozess unter *syn*-Eliminierung des Isopropoxy-Substituenten zusammen mit einem Wasserstoffatom vom benachbarten C-Atoms (β -Spaltung) ohne Bildung von Zwischenprodukten verläuft.

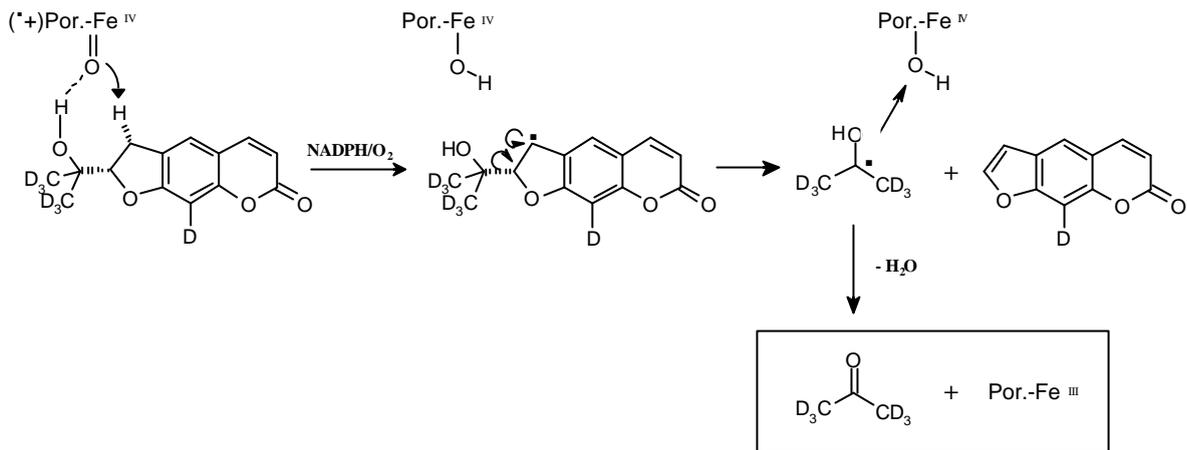


Abbildung 10: Mechanismus der Psoralen-Synthese

(■), Radikal; D, Deuterium; Por.-Fe, Porphyrin-Eisen-Komplex mit verschiedenen Wertigkeiten des Eisens.

A.3.5 Hydroxylierung und *O*-Methylierung des Psoralens

Hydroxylierungen und Methoxylierungen von Psoralen in 5- und/oder 8-Position führen zu einer Vielzahl in der Natur vorkommender Furanocumarine (**Abb. 7**). Obgleich das 8-Hydroxymarmesin in *R. graveolens* als eine Zwischenstufe in der Biosynthese des Xanthotoxins postuliert wurde (Murray *et al.*, 1982), scheint die Hydroxylierung auf der Stufe der Psoralene bevorzugt zu sein. Hydroxylierungen in 5- oder 8-Position führen zum Bergaptol bzw. Xanthotoxol mit anschließender Methylierung zum Bergapten bzw. Xanthotoxin. Eine weitere Möglichkeit besteht in der zweifachen Hydroxylierung des Psoralens zum 5,8-Dihydroxypsoralen und späterer Methylierung. Während die Umsetzung des Psoralens zum Xanthotoxol noch nicht geklärt ist, konnte für die Umsetzung zum Bergaptol eine Psoralen 5-Monooxygenase-Aktivität aus Mikrosomen induzierter *A. majus* Zellen gemessen und das Enzym als Cytochrom P450-Monooxygenase identifiziert werden (Hamerski & Matern, 1988b). Inhibitorstudien zeigten, dass es sich um eine zusätzliche

P450-Monooxygenase neben der Marmesin- bzw. Psoralensynthese handelt (Hamerski, 1989). Es ist davon auszugehen, dass auch die Hydroxylierungen zum Xanthotoxol bzw. Dihydroxypsoralen durch P450-Monooxygenasen katalysiert werden.

Die Methylierungen werden von zwei löslichen *O*-Methyltransferasen katalysiert. Positionsspezifische Bergapto- (BMT) und Xanthotoxol-*O*-Methyltransferasen (XMT) konnten bereits aus *R. graveolens* (Thompson *et al.*, 1978; Sharma *et al.*, 1979) und später aus Zellkulturen von *P. crispum* (Hauffe *et al.*, 1986) partiell gereinigt und unterschieden werden. Die XMT katalysiert in *R. graveolens* und *P. crispum* spezifisch die Umsetzung von Xanthotoxol zu Xanthotoxin. Während im Falle der BMT aus *R. graveolens* nur die Umsetzung von Bergapto- zu Bergapten beschrieben ist, katalysiert die BMT aus *P. crispum* die Methylierung von Bergapto-, 5,8-Dihydroxypsoralen sowie 5-Hydroxyxanthotoxin (Hauffe *et al.*, 1986). Weiterhin ist unklar, ob die Methylierung des 8-Hydroxybergaptens über die XMT oder eine dritte, noch nicht beschriebene OMT katalysiert wird.

Die Daten betreffend der Methyltransferase-Aktivitäten lassen noch keinen Schluss auf die Reihenfolge der letzten Schritte der Isopimpinellin-Biosynthese zu. So wurde in den Wurzeln von *R. graveolens* (Innocenti *et al.*, 1983) und aus Suspensionskulturzellen von *P. crispum* (Hauffe *et al.*, 1986) das sehr labile 5,8-Dihydroxypsoralen als Vorstufe des Isopimpinellin vorgeschlagen. Dahingegen postulierten Abu-Mustafa *et al.* (1969) auf Basis von kinetischen Einbau-Analysen in *A. majus* eine Isopimpinellin-Synthese über Bergapten und Xanthotoxin. In Fütterungsstudien an *R. graveolens* Zellkulturen dominiert die Route von Xanthotoxin über 5-Hydroxyxanthotoxin (Brown & Sampathkumar, 1977).

A.4 *O*-Methyltransferasen (OMTn)

Methylierungsreaktionen sind im Sekundärstoffwechsel weitverbreitet und wurden aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Säugern beschrieben (Ibrahim *et al.*, 1998).

Methyl donor ist meist *S*-Adenosyl-*L*-methionin- (SAM). Die OMTn (EC 2.1.1) dienen unterschiedlichsten Zwecken: Sie verändern die physiologischen Eigenschaften ihrer Substrate und reduzieren die chemische Reaktivität phenolischer Gruppen (Zhu *et al.*, 1994).

A.4.1 Vorkommen und Bedeutung von OMTn

Die *O*-Methylierung endogener Metabolite wie Dopamin oder Xenobiotika in menschlichen und tierischen Organismen wird von Mg^{2+} -abhängigen Catechol-OMTn katalysiert. Catechol-OMTn spielen u.a. eine wichtige Rolle beim Abbau der Katecholamin-Neurotransmitter Dopamin und Noradrenalin. Ein verminderter Abbau von Dopamin wurde in Verbindung mit der Störung eines auf dem Chromosom 22 lokalisierten Catechol-OMT Gens als möglicher Faktor der Schizophrenie beschrieben (Shifman *et al.*, 2002). Den Einfluss der COMT auf den menschlichen Blutdruck durch Abbau des Noradrenalins zeigte die Verwendung eines selektiven Catechol-OMT Inhibitors (Jordan *et al.*, 2002). Zur Behandlung des auf einen zu geringen Dopamin-Spiegel zurückzuführenden Morbus Parkinson werden COMT-Inhibitoren zur Verminderung des Dopamin-Abbaus durch Catechol-OMTn verwendet (Rabasseda, 1999). *O*-Methylierungen spielen eine entscheidende Rolle in der Biosynthese des Hormons Melatonin (Axelrod *et al.*, 1960). Die Detoxifizierung reaktiver Hydroxylgruppen wurde anhand einer Reduzierung der Karzinogenität einiger Flavonoide durch Catechol-OMT katalysierte *O*-Methylierungen nachgewiesen (Zu *et al.*, 1994).

In Pflanzen sind OMTn zwar weniger gut untersucht, doch einige Aspekte zeichnen sich ab. So sind SAM-abhängige OMTn u.a. an der Morphogenese und verschiedenen Abschnitten des Phenylpropan-Stoffwechsels beteiligt.

Phenylpropanoide spielen eine wichtige Rolle in der Pflanzenentwicklung und der Interaktion mit der Umwelt. Beispielsweise ist die Methylierung von 4-Caffeoyl-CoA durch Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferasen (CCoAOMTn) eingehend studiert worden. Gut untersucht ist die Bedeutung dieser Enzyme in der induzierten Abwehr der Pflanze durch Bildung lignin-ähnlicher Polymere (Pakusch *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1991) wie auch die nach derzeit gültiger Vorstellung beschriebene Beteiligung von CCoAOMTn an der

Biosynthese der Guaiacyl [G]-Einheiten in der Ligninbiosynthese (Ye *et al.*, 1994 ; Ye *et al.*, 2001). Die Syringyl [S]-Einheiten des Lignins werden dagegen bevorzugt über Kaffeesäure *O*-Methyltransferasen (COMTn) katalysierte Methylierungsreaktionen (Atanassova *et al.*, 1995) gebildet. Diese Enzyme sind meist multifunktionell (Poeydomenge *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 2000) und setzen bevorzugt die von der Kaffee- und 5-Hydroxyferulasäure abgeleiteten Aldehyde und Alkohole um (Li *et al.*, 2000; Parvathi *et al.*, 2001; Zubieta *et al.*, 2002). Zudem gibt es viele COMT-ähnliche Enzyme, die beispielsweise auch Flavonoide akzeptieren. Deren physiologische Funktion ist noch nicht geklärt (Gauthier *et al.*, 1998; Schröder *et al.*, 2002). Die BMT und XMT, zwei OMTn der Furanocumarinbiosynthese, werden zusammen mit den anderen Enzymen des Cumarinweges durch Elicitoren und in ihrer natürlichen Umgebung durch pilzliche Parasiten induziert. Sie bilden Bergapten bzw. Xanthotoxin, zwei antimikrobielle Verbindungen, die den Pflanzen als Phytoalexine dienen (Hauffe *et al.*, 1986). In anderen Pflanzen sind OMTn an der Methylierung einfacherer Phenolderivate wie Orcinol, Eugenol und Chavicol beteiligt. Sie wirken als Duft- und Lockstoffe (Wang & Pichersky, 1999; Lavid *et al.*, 2002).

Einfache Phenylpropanoide und Flavonoide besitzen eine hohe Strukturähnlichkeit. Dennoch werden Methylierungen von Vertretern der zwei Substanzgruppen durch verschiedene OMT-Klassen katalysiert (Ibrahim *et al.*, 1998). Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch innerhalb der Flavonoide die Chalkone (Maxwell *et al.*, 1992; Ichimura *et al.*, 1997), Flavanone (Rakwal *et al.*, 1996), Isoflavanone (Akashi *et al.*, 2003), Flavone (Ebel *et al.*, 1972), Isoflavone (Khouri *et al.*, 1988) und Flavonole (Gauthier *et al.*, 1996; Cacace *et al.*, 2003) von verschiedenen Enzymunterklassen mit hoher Substratspezifität methyliert werden. Flavonoide dienen den Pflanzen als UV-Schutz und als Insekten-anlockende Blütenpigmente. Außerdem wurden ihnen auch Funktionen als Signalmoleküle in Pflanzen-Symbionten-Interaktionen (Pueppke *et al.*, 1998), als Stimulatoren für die Pollenreifung (Ylstra *et al.*, 1992) und als Vorstufen induzierbarer Komponenten (Phytoalexine) bei mikrobiellem Befall (Dakora & Phillips, 1996; Akashi *et al.*, 2003) zugeschrieben. Flavonoide, die durch *O*-Methylierung eine Veränderung ihrer Löslichkeit und intrazellulären Verteilung aufweisen, zeigen eine verstärkte antimikrobielle Aktivität (Ibrahim *et al.*, 1987).

Antimikrobielle Alkaloide der Isoquinolinbiosynthese wie Berberin oder Palmatin dienen den Pflanzen als Phytoalexine. Ihre Synthese und auch die daran beteiligten OMTn sind induzierbar (Frick & Kutchan, 1999; Sato *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1994; Morishige *et al.*, 2000; Morishige *et al.*, 2002).

A.4.2 Einteilung und Nomenklatur

Pflanzliche OMTn können in zwei große Klassen eingeteilt werden (Joshi & Chiang, 1998). Die Klasse I enthält Mg^{2+} -abhängige OMTn niedrigen Molekulargewichtes (23-27 kDa) und besteht bislang ausschließlich aus Caffeoyl-CoA-OMTn. Die Klasse II setzt sich aus OMTn mit Molekulargewichten von 38-43 kDa zusammen, die keine Mg^{2+} -Ionen für die katalytische Aktivität benötigen.

Differenzierter ist die von Ibrahim *et al.* (1998) vorgeschlagene Einteilung nach Aminosäure-Homologien in drei Klassen mit Untergruppen:

Klasse A: OMTn zur Methylierung von einfachen Phenylpropanoiden

Gruppe 1: Kaffee- / 5-OH-Ferulasäure (Poeydomenge *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 2000)

Gruppe 2: CoA-Ester der Kaffee- / 5-OH-Ferulasäure (Schmitt *et al.*, 1991; Ye *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 2001).

Gruppe 3: andere Phenylpropanoide z.B. Furanocumarine (Thompson *et al.*, 1978; Hauffe *et al.*, 1986)

Gruppe 4: einfache Phenole, Phenolester (Wang & Pichersky, 1999; Lavid *et al.*, 2002).

Gruppe 5: Polyketide

Klasse B: OMTn zur Methylierung von Flavonoiden

Gruppe 1: Flavonole und Flavone (Gauthier *et al.*, 1996; Cacace *et al.*, 2003); Ebel *et al.*, 1972)

Gruppe 2: Chalcone und Flavanone (Maxwell *et al.*, 1992; Ichimura *et al.*, 1997; Rakwal *et al.*, 1996)

Gruppe 3: Pterocarpane und ihre Isoflavon-Vorstufen (Khouri *et al.*, 1988)

Gruppe 4: Flavane und Anthocyane (Jonsson *et al.*, 1982)

Klasse C: OMTn zur Methylierung von Alkaloiden

Gruppe 1: Benzylisoquinolin-Alkaloide (Sato *et al.*, 1993; Frick & Kutchan, 1999)

Gruppe 2: Morphinan-Alkaloide, z.B. Thebain, Codein

Gruppe 3: Carboxymethylierung von Secologanin, Lysergsäure usw.

Die Klassifizierung der pflanzlichen OMT erfolgt nach den Regeln der „Commission of Plant Gene Nomenclature“. Der formale Aufbau der Benennung eines Pflanzengens besteht (a) aus einer speziellen Abkürzung nach SwissProt, (b) dem Namen der Genfamilie und (c) eines Nummernkürzels. OMT cDNA-Klone innerhalb einer bestimmten chemischen Klasse (z.B. Flavonoide) sind in Gruppen unterteilt, die die Strukturvariationen des Akzeptormoleküls der Klasse darstellen. Gene innerhalb einer bestimmten Gruppe werden auf diese Weise Nummernkürzel für jede Pflanzenspezies zugeteilt, chronologisch nach GenBank/EMBL-Einträgen geordnet. Beispielsweise steht *Chram.OMTB1.1* für *Chrysosplenium americanum* Flavonol-*O*-Methyltransferase (*OMT*) Gen, U16794. Die Abkürzung der Pflanzenspezies braucht nach der ersten Nennung nicht mehr mit angegeben werden; das verbleibende Kürzel (*OMTB.1*) bezeichnet dann das Genprodukt. Für induzierbare Gene wird das Anhängen eines Suffixes an das Nummernkürzel empfohlen, wenn die Gene (a) durch Mikroorganismen, (b) Umgebungsstress oder (c) durch biotische/abiotische Elicitoren induziert werden.

A.4.3 Aufbau und Struktur pflanzlicher OMTn

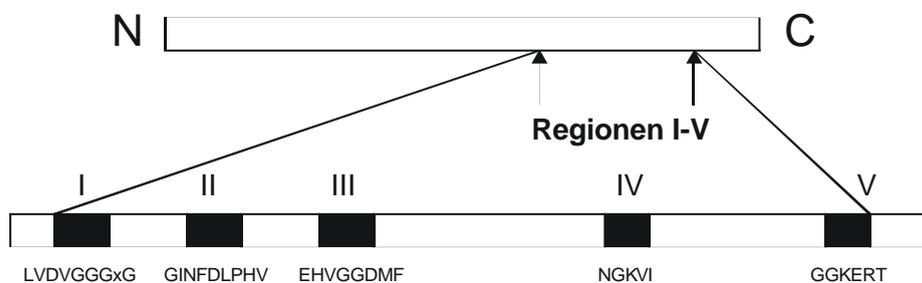
A.4.3.1 Konservierte Sequenzmotive

Durch den Vergleich von *N*-, *O*- und *S*-Methyltransferasen, SAM-Synthasen, SAM-Decarboxylasen und SAH-Hydrolasen von Bakterien, Pflanzen und Säugern (Kagan & Clarke, 1994) konnten erstmals mehrere Sequenzmotive von Enzymen, die in die Methylierung von DNA involviert sind, beschrieben werden. Es wurden Konsensussequenzen (**Abb. 12**) abgeleitet, die aber wegen häufiger „*mismatches*“ nicht alle auf pflanzlichen Methyltransferasen übertragbar sind (Joshi & Chiang, 1998). Weitaus spezifischere Sequenzmotive wurden durch den Vergleich von OMTn u.a. aus dem Alkaloid-, Lignin- und Flavonoidstoffwechsel, einer Putrescin NMT aus Tabak und verschiedenen CMTn der Phytosterolbiosynthese aufgestellt (Joshi & Chiang, 1998). Drei Konsensusmotive (**Tab. 1** u. **Abb. 12**) wurden vorgeschlagen und als SAM-Bindemotive postuliert. Die Anordnung der Motive ist vergleichbar mit dem Vorschlag von Kagan & Clarke (1994). Mit den untersuchten OMT-Sequenzen konnte eine Wiederfindungsrate von 98-100 % bei maximal 3 „*mismatches*“ pro Motiv gezeigt werden. Die Sequenzregionen stehen immer in definierten Abstände zueinander, was die für die Ausbildung der SAM-Bindetasche notwendige spezifische räumliche Beziehung widerspiegelt.

Tabelle 1: Konsensusmotive SAM-abhängiger pflanzlicher Methyltransferasen nach Joshi & Chiang (1998)

Motiv	Konsensussequenz
A	(V/I/L) (V/L) (D/K) (V/I) G G x x (G/A)
B	(V/I/F) (A/P/E) x (A/P/G) D A x x x K (W/Y/F)
C	(A/P/G/S) (L/I/V) (A/P/G/S) x x (A/P/G/S) (K/R) (V/I) (E/I) (L/I/V)

Aussagekräftiger für die meisten pflanzlichen OMTn scheinen die von Ibrahim *et al.* (1998) vorgeschlagenen Motive zu sein, zu deren Aufstellung nur OMT-Sequenzen aus dem Lignin-, Flavonoid-, Furanocumarin- und Alkaloidstoffwechsel und von verschiedenen Bakterien, Pilzen und Säugern verwendet wurden. Alle diese OMTn kodieren für Proteine ähnlicher Größe (37,6-42,3 kDa), bis auf die CCoAOMT aus *Petroselinum crispum* (Schmitt *et al.*, 1991) und die Catechol-OMT der Ratte (Vidgren *et al.*, 1994) mit 27,1 kDa bzw. 24,7 kDa. Es wurden fünf hochkonservierte Regionen (**Abb. 11** u. **12**) im Bereich des C-Terminus ermittelt, die den von Bugos *et al.* (1991) anhand einer einzelnen COMT-Sequenz für die SAM-Bindung vorgeschlagenen Motiven sehr ähnlich sind. Diese Regionen sind besonders bei OMTn, die Methylierungen von Ligninvorstufen, Flavonolen, Chalconen und Furanocumarinen katalysieren, hochkonserviert (92-100 %). Fast jede von Ibrahim *et al.* (1998) untersuchte OMT zeigt eine Identitätsrate der Motive von 61-100 %. Ausnahme bildet die CCoAOMT aus *P. crispum* (< 10 %). Für die BMT aus *P. crispum* deuten 97 % Identität auf eine hohe Identität mit den verglichenen COMTn hin. Diese Daten können aber nicht überprüft werden, da die BMT-Sequenz aus *P. crispum* bisher nicht veröffentlicht wurde.

**Abbildung 11: Relative Positionen der Konsensusregionen I-V in O-Methyltransferase Polypeptiden.**

Die Aminosäuresequenzen der Konsensusbereiche nach Ibrahim (1997) sind angegeben; x steht für eine beliebige Aminosäure.

Während den Regionen I-III und V Relevanz für die Ausbildung der SAM-Bindetasche zugeschrieben und dies neuerdings durch Röntgenstrukturdaten von pflanzlichen OMTn (Zubieta *et al.*, 2001; Zubieta *et al.*, 2002; Gang *et al.*, 2002) bekräftigt wurde, ist Region IV vermutlich an der Bindung von Metallionen beteiligt. Dieser Region konnte in den kristallisierten OMTn keine Funktion zugeschrieben werden, da ihre Aktivität unabhängig von divalenten Ionen ist. Durch Röntgenstrukturanalyse einer Mg²⁺-abhängigen Catechol-OMT aus der Ratte (Vidgren *et al.*, 1994) und Vergleich mit ebenfalls Mg²⁺-abhängigen CCoAOMTn (Schmitt *et al.*, 1991; Ibdah *et al.*, 2003) konnte diese Funktion näher beschrieben werden.

1	11	21	31	41	51	61
MGSTG ETQ	MTPTQVSDEE	ANLFAMQLAS	ASVLPMLKS	AIELDLLEIM	AKSIPAGPGA	FVSPSELAAQ
71	81	91	101	111	121	131
LPTKNNPDAP	VMLDRILRLL	ASYSVLTC2L	RTLDPGKVER	LYGLAPVCKF	LTKNEDGVSI	APLLLNMNQDK
141	151	161	171	181	191	201
VLMSWYHLK	DAVLDDGGIPF	NKAYGMTAFE	YHGTDPRFNK	VFN GMSDHS	TITMKKILET	YKGFEGDKIV
211	221	231	241	251	261	271
VDVGGGTGA	LNMIIVSKYPS	IKGINFDLPH	VIEDAPSYPG	VEHVGGDMFV	SVPKGDAIFM	KWICHDWSDE
281	291	301	311	321	331	341
HCLKFLKNCY	EALPDNGKVI	<u>LAECILPEAP</u>	DTSLATKNV	HIDVIMLAHN	PGGKERTKE	FEALAKGAGF
351	361					
GF ACCAF	NTWVMEFLKK	A				

Abbildung 12: Konsensussequenz pflanzlicher O-Methyltransferasen

Grundlage waren 12 COMT-Sequenzen (Genbankeinträge s. D.3.2.). Die Positionen der Motive nach Kagan & Clarke (1994) sind unterstrichen, nach Joshi & Chiang (1998) fettgedruckt und nach Ibrahim *et al.* (1998) grau unterlegt.

Die von Kagan & Clarke (1994) sowie Joshi & Chiang (1998) postulierten Motive befinden sich in ähnlichen Positionen, wobei die Motive a und c den Motiven I und IV nach Ibrahim *et al.* (1998) entsprechen. Im Bereich des Motivs B konnte durch „modelling“ pflanzlicher OMTn (Gang *et al.*, 2002) die Beteiligung einzelner Aminosäuren an der SAM-Bindung nachgewiesen und somit die postulierte Funktion des Motivs bestätigt werden.

A.4.3.2 Kristallstrukturen

Durch die Röntgenbeugung einer SAM-abhängigen Catechol-OMT der Ratte (Vidgren *et al.*, 1994) konnten zahlreiche Aminosäurereste identifiziert werden, die an der SAM-, Mg^{2+} - und Substratbindung beteiligt sind. CCoAOMTn sind von ähnlicher Größe und ebenfalls Mg^{2+} -abhängig. Im Vergleich mit der CCoAOMT aus *Zinnia elegans* konnten jedoch nur 33 % der Aminosäuren, die an der SAM-Bindung beteiligt sind, zugeordnet werden (Ye *et al.*, 1994). In Anlehnung an die Struktur der Catechol-OMT der Ratte wurden bereits dreidimensionale Homologie-Modelle für CCoAOMTn (Hoffmann *et al.*, 2001) erstellt. Die Kristallisation einer CCoAOMT, die abschließende Daten liefert, steht noch aus. Allerdings wurden in kristallisierten DNA-Methyltransferasen (Schluckebier *et al.*, 1995) Domänen beschrieben, die den katalytischen Domänen in Catechol-OMTn strukturell und funktionell entsprechen.

Als erste pflanzliche SAM-abhängige OMTn wurden die Chalcon (ChOMT) und die Isoflavon *O*-Methyltransferase (IOMT) aus *Medicago sativa* (Maxwell *et al.*, 1992; He & Dixon, 1996; Zubieta *et al.*, 2001) sowie eine COMT derselben Pflanze (Zubieta *et al.*, 2002) kristallisiert. Die erstgenannten Enzyme wurden zuvor als Monomere beschrieben. Sie konnten aber im Gegensatz zu den vorher kristallisierten, nicht pflanzlichen monomeren Methyltransferasen als Homodimere identifiziert werden,.

Die pflanzlichen OMTn sind aus 13 α -Helices und 9 β -Faltblattstrukturen (**Abb. 13**) aufgebaut, wobei die α -Helices 9-13 und β -Faltblattstrukturen 3-9 eine lange C-terminale katalytische Domäne für die SAM-Bindung und Substrat-Methylierung bilden. Diese als „ α/β -Rossmann-fold“ bezeichnete Struktureinheit mit hohem Anteil an β -Faltblattstrukturen tritt bei allen bislang strukturell charakterisierten SAM-abhängigen Methyltransferasen auf (Schubert *et al.*, 2003). Eine kleinere N-terminale Domäne ist an der Dimerisierung beteiligt und bildet die Rückseite der Substratbindetasche des zweiten Monomers. Das Auftreten eines breiten Spaltes zwischen den Dimeren im Bereich dieser Domäne scheint pflanzlichen OMTn gemein zu sein und die Substratbindung zu beeinflussen.

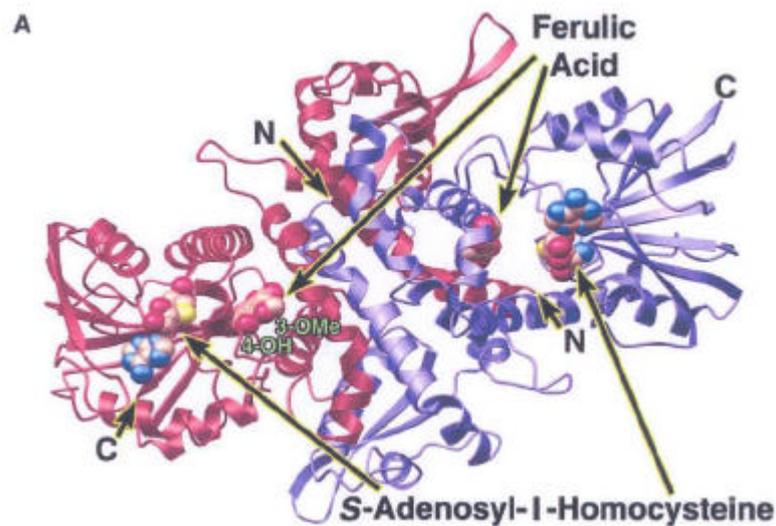


Abbildung 13: Kristallstruktur des COMT-Homodimers aus *Medicago sativa*

Monomer A ist rot, Monomer B violett eingefärbt. Die Ferulasäure als Produkt der Methylierungsreaktion von Kaffeesäure und *S*-Adenosyl-L-homocystein sind als Kugelmodelle abgebildet. Der breite Spalt im N-terminalen Bereich zwischen den Monomeren (Mitte der Abbildung) scheint pflanzlichen OMTn gemein zu sein und beeinflusst die Substratbindung.

Vergleiche von cDNA weiterer pflanzlicher OMTn sowie DNA- und Catechol-Methyltransferasen (Schluckebier *et al.*, 1995; Vidgren *et al.*, 1994) zeigten, dass die Motive für die katalytische SAM-Bindungsdomäne bei allen SAM-abhängigen Methyltransferasen hochkonserviert sind, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte vermitteln die Bindung des SAH in den kristallisierten Komplexen.

Die Substratspezifität der OMTn wird durch die katalytische Domäne im C-Terminus des einen Monomers und durch die N-terminale Domäne des symmetrisch arrangierten zweiten Monomers bestimmt, die die Rückwand der Substratbindetasche ausbildet. Die in die Tasche ragenden aromatischen und aliphatischen Seitenketten der Aminosäuren definieren durch van-der-Waals-Kräfte die Spezifitäten. Die Kristallstrukturen der zwei OMTn aus *M. sativa* haben erstmals die strukturellen Grundlagen der Substratspezifitäten innerhalb der großen OMT-Familie erkennen lassen.

Der Mechanismus der Methylgruppenübertragung wird von Zubieta *et al.* (2001) wie folgt postuliert: Zwei hochkonservierte Methionin-Reste in pflanzlichen OMTn orientieren das aromatische Ringgerüst des Substrates so, dass die zu methylierende Hydroxylgruppe dem SAM und der katalytischen Domäne der OMT präsentiert wird. Ein hochkonserviertes Histidin, das mit zwei Glutaminsäuren über Wasserstoffbrückenbindungen interagiert,

deprotoniert zunächst die Hydroxylgruppe. Das generierte Substrat Phenolat-Anion greift nukleophil die positiv geladene Methylgruppe des SAM an. Die Mutation des Histidins führt zum Verlust der Enzymaktivität und bestätigt seine postulierte Rolle.

Die zwei Domänen, die die Substratspezifitäten beeinflussen, dienen als Grundlage zur Definition einer OMT-Konsensussequenz, mit der Schröder *et al.* (2002) eine Zuordnung von Substraten zu noch nicht in ihren Funktionen beschriebenen pflanzlichen OMTn ermöglichen wollten. Es wurde gezeigt, dass bereits ein bis zwei unterschiedliche Aminosäuren in diesen Domänen die Substratspezifität verändern. Verlässliche Voraussagen konnten mit diesem Modell allerdings noch nicht getroffen werden.

Die Strukturaufklärung der SAM-abhängigen COMT aus *M. sativa* (Edwards & Dixon, 1991; Zubieta *et al.*, 2002) bestätigte die obigen Ergebnisse. In ihrer Tertiär- und Quartärstruktur ähnelte die COMT den zuvor charakterisierten *Medicago*-OMTn sehr; das Enzym liegt ebenfalls als Dimer vor, und die Dimerisierung ist essentiell für die Aktivität des Enzyms. COMTn zeigen eine im Gegensatz zu anderen OMTn breite Substratspezifität (Zubieta *et al.*, 2002). Anhand der kristallisierten COMT konnte eine im Vergleich zur ChOMT und IOMT räumlich größere Substratbindetasche gezeigt werden, in die verschiedene Substrate unspezifisch gebunden werden.

Mit den Kristallstrukturen der IOMT und COMT als „*templates*“ wurden Homologiemodelle für eine Chavicol und eine Eugenol OMT aus *Ocimum basilicum* erstellt (Gang *et al.*, 2002). Diese Enzyme sind untereinander sehr ähnlich (90 % auf Proteinebene), und der Austausch einer einzelnen Aminosäure kann zur jeweils anderen Substratspezifität führen. Die ausgetauschte Aminosäure liegt außerhalb der oben angeführten konservierten Sequenzmotive, so dass die Substratspezifität auch durch andere Sequenzelemente entscheidend mitbestimmt wird.

Abweichend von den bisher beschriebenen OMTn scheint die Salicylsäure Carboxyl-Methyltransferase (Zubieta *et al.*, 2003), die kürzlich ebenfalls kristallisiert wurde, mit verschiedenen Alkaloid NMTn aus der Coffein-Biosynthese eine neue Familie von Methyltransferasen zu bilden. Unter anderem besitzen diese Enzyme eine andere Quartärstruktur. Die Dimere enthalten jeweils eine Substrattasche pro Untereinheit ohne Beteiligung von Aminosäuren des zweiten Monomers.

A.4.4 Regenerationszyklus des SAM

Bei Übertragung der Methylgruppe auf das Akzeptorsubstrat entsteht aus *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) der Adenosinthioether *S*-Adenosyl-L-homocystein (SAH), der Homocystein abspaltet (**Abb. 14**). Methionin wird aus Homocystein durch Transfer einer Methylgruppe des N_5 -Methyltetrahydrofolat regeneriert (Amthor, 2003). Die Homocystein *S*-Methyltransferase katalysiert die Reaktion mit Hilfe des vom Vitamin B₁₂ abgeleiteten Methylcobalamin als Coenzym. Das Methyltetrahydrofolat wird aus Tetrahydrofolat durch Übertragung eines Methylrestes aus Ameisensäure oder Serin (Amthor, 2003) generiert.

Methionin selbst besitzt kein hohes Gruppenübertragungspotential. Es wird erst durch die Reaktion mit ATP aktiviert. Dabei wird ein Adenosyl-Rest auf das Schwefel-Atom übertragen. Die positive Ladung des benachbarten Sulfonium-Ions aktiviert die Methylgruppe, so dass die Übertragung erleichtert wird.

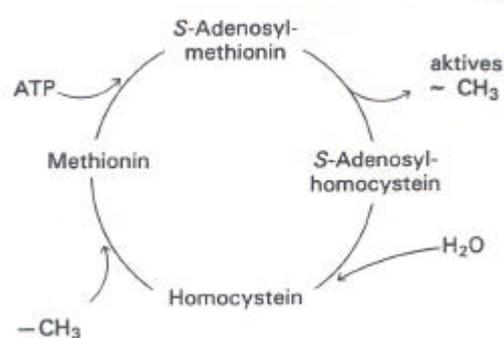


Abbildung 14: Regenerationszyklus von SAM

A.5 Zielsetzung der Arbeit

Lineare Furanocumarine kommen vor allem in den Familien der Apiaceae und Rutaceae vor. Aufgrund ihrer phototoxischen, cancerogenen und mutagenen Eigenschaften stellen die Psoralene ein Gebiet wachsenden Interesses dar. Zurückzuführen sind diese Wirkungen auf ihre kovalente Vernetzung mit Doppelstrang-DNA unter Lichteinfluss, so dass die Replikation der DNA fehlerhaft verläuft. Durch „*antisense*-Hemmungen“ oder durch die RNAi-Methode (RNA-mediated interference) ist es möglich, die Enzyme der Furanocumarinbiosynthese auszuschalten. Die Züchtung furanocumarinfreier Nutzpflanzen ohne toxische Eigenschaften wäre auf diese Weise möglich.

Durch *in vitro*-Studien mit pflanzlichen Zellkulturen konnte die Furanocumarinbiosynthese aus *A. majus* (Hamerski, 1989) und *P. crispum* (Tietjen *et al.*, 1983; Tietjen & Matern, 1983; Wendorff & Matern, 1986) in wesentlichen Teilen aufgeklärt und mehrere an der Synthese beteiligte Enzyme identifiziert werden. Dazu gehören Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen und *O*-Methyltransferasen.

Die Bergapton und Xanthotoxol *O*-Methyltransferasen katalysieren die Methylierung zu Bergapten und Xanthotoxin. Obgleich beide OMTn bereits aus *P. crispum* L. (Hauffe *et al.*, 1986) und *R. graveolens* L. (Sharma *et al.*, 1979) gereinigt und aus *P. crispum* L. charakterisiert wurden, sind ihre DNA- und Aminosäuresequenzen bislang nicht publiziert. Auf eine starke Ähnlichkeit der BMT aus *P. crispum* zu heterologen COMTn wurde von Ibrahim *et al.* (1988) hingewiesen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Klonierung von *O*-Methyltransferasen, insbesondere der BMT, der XMT sowie COMTn aus *A. majus*. Zunächst wird für die RNA-Isolierung optimal induziertes pflanzliches Ausgangsmaterial gewonnen. Mit Hilfe degenerierter Primer werden dann OMT-spezifische Fragmente isoliert und anschließend durch RACE-Methoden („Rapid Amplification of cDNA ends“) oder durch Genbank-Screening vollständige cDNA-Klone generiert. Der funktionelle Nachweis der rekombinanten Enzyme erfolgt durch heterologe Expression mit anschließender biochemischer Charakterisierung. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der BMT aus *P. crispum* zu heterologen COMTn (Ibrahim *et al.*, 1998) werden die Sequenzen von BMT und COMT eingehend miteinander verglichen und wesentliche Unterschiede herausgearbeitet.

B. Material

B.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid	Promega (Mannheim)
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Bacto-Agar	Difco Lab (Detroit, USA)
Blue Dextran 2000	Amersham (Braunschweig)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Caseinhydrolysat (NZ-Amin)	ICN Biomedicals (Meckenheim)
Desoxyribonucleinsäure zur Hybridisierung (aus Heringssperma)	Sigma (Deisenhofen)
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Desoxycholsäure	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ficoll Type 400	Sigma (Deisenhofen)
Folin Ciocalteu Reagenz	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd	Sigma (Deisenhofen)
Formamid	Sigma (Deisenhofen)
GeneRuler 1 kp DNA-Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 50 bp DNA-Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 100 bp DNA-Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Guanidiniumthiocyanat	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma (Deisenhofen)
Hybond N ⁺ (positiv geladene Nylonmembran)	Amersham (Braunschweig)
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumascorbat	Merck (Darmstadt)
Natriumsarcosinat	Sigma (Deisenhofen)
Pepton aus Casein	Roth (Karlsruhe)
Phenol, gesättigt mit 0,1 M Citrat-Puffer	Sigma (Deisenhofen)
PIPES (Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure))	Merck (Darmstadt)
<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i> (Pmg)	Sammlung des Institutes
Polyacrylamid-Gebrauchslösung	Promega (Mannheim)
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva (Heidelberg)
Roti [®] -Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Rotiszint [®] eco plus	Roth (Karlsruhe)
Select Agar	GibcoBRL (Eggenstein)

Spermidin	Roth (Karlsruhe)
Tetracyclin	Roth (Karlsruhe)
N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
TWEEN 20	Sigma (Deisenhofen)
Whatman 3MM Chr	Whatman (Banbury, UK)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma in analysenreiner Qualität bezogen.

B.2 Radiochemikalien

Substanz	Spezifische Aktivität	Bezugsquelle
[α - ^{32}P]dCTP	> 3000 Ci/mmol	ICN (Meckenheim)
S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]-methionin	52 mCi/mmol	Hartmann (Braunschweig)

B.3 Substrate

Cumarine- und Furanocumarine:

Bergaptol	Extrasynthese (Genay, Frankreich)
Xanthotoxol	Roth (Karlsruhe)
Psoralen	Roth (Karlsruhe)
Umbelliferon	Sammlung des Institutes
Daphnetin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Esculetin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
4-Cumarsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
3-Cumarsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2-Cumarsäure	Fluka (Buchs, Schweiz)
3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Zimtsäuren:

Kaffeesäure	Roth (Karlsruhe)
Kaffeensäuremethylester	Sammlung des Institutes
Hydrokaffeesäure	Sammlung des Institutes
5-Hydroxyferulasäure	Sammlung des Institutes
Caffeoyl-CoA	Sammlung des Institutes
Sinapinsäure	Roth (Karlsruhe)

Flavonoide:

Apigenin	Roth (Karlsruhe)
(+)- u. (-)-Catechin	Roth (Karlsruhe) / Sigma-Aldrich (Steinheim)
(+)- u. (-)-Epicatechin	Roth (Karlsruhe) / Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaempferol	Roth (Karlsruhe)
Dihydrokaempferol	Roth (Karlsruhe)
Naringenin	Roth (Karlsruhe)
Quercetin	Roth (Karlsruhe)

B.4 Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Expand High Fidelity (Taq-Pfu-Polymerasengemisch)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
MMLV-Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
Pfu DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Boehringer (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Roth (Karlsruhe)
RNase H	Usb (Cleveland, USA)
Superscript II RT	Invitrogen (Leek, Niederlande)
T4-Ligase	Promega (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq DNA Polymerase	Promega (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Terminale Desoxynukleotid Transferase	Promega (Mannheim)

B.5 Kommerzielle Reaktionssätze

Concert Rapid Plasmid Miniprep System	GibcoBRL (Eggenstein)
Dynabeads mRNA Direct Kit	Dynal Biotech (Hamburg)
Gel Filtration LMW Calibration Kit	Amersham Biosciences (Braunschweig)
GeneRacer Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences (Braunschweig)
Nucleo Spin [®] /NucleoTrap [®]	Macherey-Nagel (Düren)
PCR Clean-up-Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
QiaexII Gel Extraktion Kit	Qiagen (Hilden)
QuikChange [®] Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Heidelberg)
Rediprime II DNA Labeling System	Amersham Biosciences (Braunschweig)
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Ultrafree-DA / DNA Extraction from Agarose Gels	Millipore (Schwalbach)

B.6 Bakterienstämme

B.6.1 *E.coli* zur Klonierung

Name	Genotyp	Hersteller
TOP 10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) θ80lac ZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara- leu)7697 galU galK rps (Str ^r) endA1 nupG	Invitrogen (Leek, Niederlande)
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ['] proAB lacIqZDM15Tn10 (Tetr)]	Stratagene (Heidelberg)
XL10-Gold	Tet ^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F ['] proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R]	Stratagene (Heidelberg)

B.6.2 *E.coli* zur Expression

Name	Genotyp	Hersteller
M15[pREP4]	Nal ^S Str ^S rif ^S lac- ara- gal- mtl- F- recA+ uvr+	Qiagen (Hilden)

B.7 Vektoren

B.7.1 *E.coli*-Vektoren

Der Vektor pCR2.1-TOPO (TOPO-TA Cloning Kit; Invitrogen, Leek, Niederlande) wurde zum Klonieren sämtlicher PCR-Fragmente verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

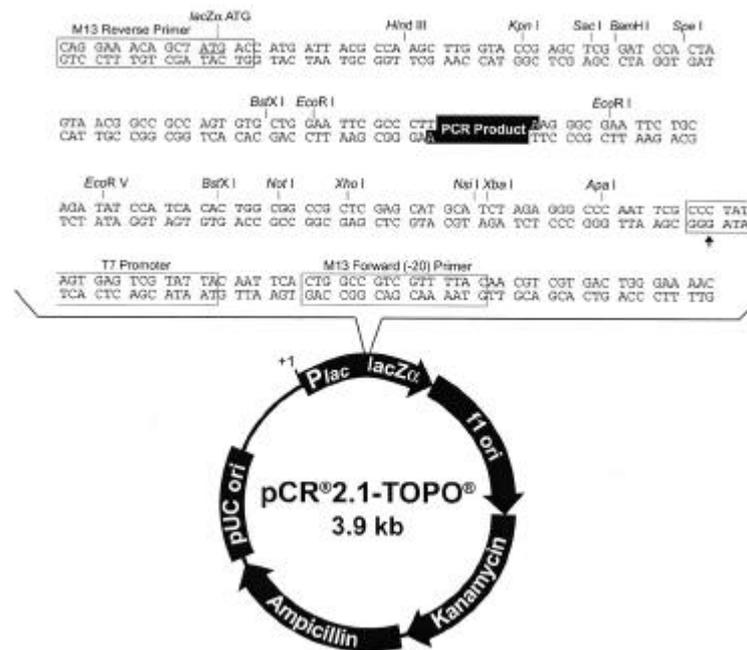


Abbildung 15: *E.coli*- pCR2.1-TOPO (Invitrogen)-Vektor

Einzig die mit dem GeneRacer Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande) generierten cDNA-Fragmente und die vollständigen Klone wurden im pCR4-TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande) kloniert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

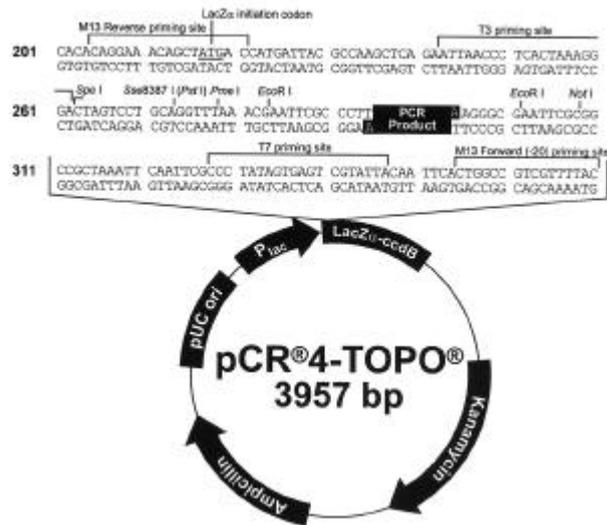


Abbildung 16: *E.coli*-pCR4-TOPO (Invitrogen)-Vektor

Beide Vektoren sind linearisiert und besitzen einfache 3'-Desoxythymidin (T)-Überhänge. Taq-Polymerasen zeigen Terminale-Transferase-Aktivität und hängen templateunabhängig einzelne Desoxyadenosine (A) an die 3'-Enden der PCR-Produkte an. Dies erlaubt eine effiziente Ligation der Inserts in den Vektor.

B.7.2 *E.coli*-Expressionsvektor

Die Expression der klonierten OMT-Gene erfolgte im pQE60-Vektor (Qiagen, Hilden). Der Vektor kodiert für eine Polyhistidin-Region, welche die Isolierung des rekombinanten Enzyms durch Affinitätschromatographie ermöglicht.

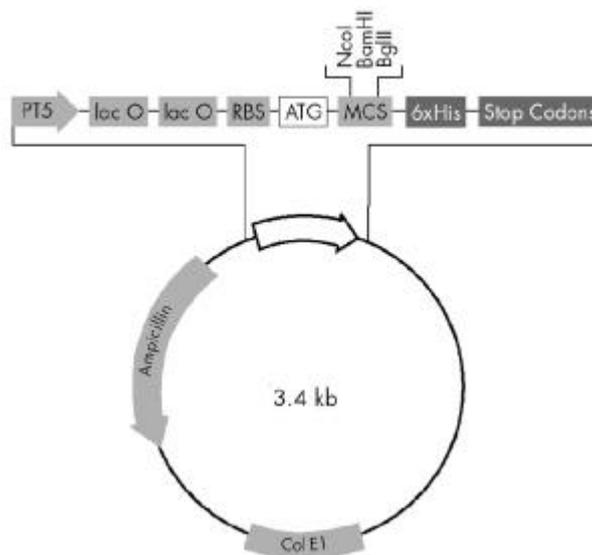


Abbildung 17: *E.coli*-Expressionsvektor pQE60

B.8 Puffer und sonstige Lösungen

B.8.1 Pflanzen- und Zellaufschluss

Polyclar-Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA
2 mM DTT
10 % (v/v) Glycerin
10 % (w/v) Polyclar

Dowex-Aufschlusspuffer:

200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5
10 mM EDTA
2 mM DTT

B.8.2 Herstellung kompetenter Zellen

TB-Puffer:

10 mM Pipes
15 mM CaCl_2
250 mM KCl, mit KOH auf pH 6,7 einstellen
55 mM MnCl_2

B.8.3 RNA-Isolierung

Extraktion Methode A:

100 mM Tris-HCL, pH 8,0
2 % CTAB
2 % PVP K30
25 mM EDTA
0,5 g/l Spermidin
nach dem Autoklavieren Zusatz von 2 % β -Mercaptoethanol

Extraktionspuffer Methode B (Giuliano et al., 1993):

4,23 M Guanidiniumthiocyanat
0,225 M Natriumacetat, pH 5,3
0,007 M Natriumsarcosinat 10 %

B.8.4 Plasmid-DNA Isolierung

Method A:

Lösung I:

5 mM Glukose
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA

Lösung II:

0,2 N NaOH
1 % SDS

Lösung III:

100 ml Aqua dest.
143 ml Eisessig
mit 10 M K-Acetat auf pH 4,8 einstellen

Method B:

GTE-Puffer:

50 mM Glukose
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA
autoklavieren
0,02 mg RNase/ml hinzugeben

NaOH/SDS:

0,2 N NaOH
1 % SDS

PAS:

29,5 ml Essigsäure
KOH-Plättchen bis pH 4,8
auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen

B.8.5 Dot-Blot

20x SSC:

3 M NaCl
300 mM Natriumcitrat
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

10x MOPS pH 7,0:

200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA

Denhardt`s Reagent 50x:

0,5 g Ficoll Typ 400
0,5 g Polyvinylpyrrolidon
0,5 g Rinderserumalbumin (BSA)

B.8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel:

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Sammelgel:

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

5 x SDS-Probenpuffer:

0,25 M Tris-HCl pH 6,8
8 % (v/v) Glycerin
6 % (w/v) SDS
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

5 x Laufpuffer:

15 g/l Tris-HCl pH 8,9
72 g/l Glycin
5 g/l SDS

Coomassie-Färbelösung:

40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
in Wasser

Entfärber:

40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
in Wasser

B.8.7 Säulenchromatographie

SEC-Elution:

50 mM Tris-HCl pH 7,5
2 mM DTT

SEC-Elution zur Bestimmung der relativen Molekülmasse:

50 mM Tris-HCl pH 7,5
200 mM NaCl

Die angegebenen Mengen an DTT wurden den Puffern unmittelbar vor Verwendung zugesetzt.

B.8.8 Sonstige Puffer und Lösungen

Lowry A:

2 % Na₂CO₃
0,1 N NaOH
0,5 % SDS

TE-Puffer, pH 8,0:

10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

TE-Puffer pH 7,5:

10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA pH 7,5

50x TAE-Puffer:

242 g Tris-HCl
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1000 ml mit Aqua dest.

B.9 Medien

B.9.1 Bakterien

LB (Luria Bertani)	10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO ₄ , 4 ml Glycerol 50 % (v/v) ad 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen, pH 7,5 einstellen, autoklavieren
LB-Agarplatten	Pro Liter LB-Medium 15 g (1,5 %) Bacto-Agar
SOC	20 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 20 mM Glukose
NZY ⁺	10 g NZ-Amin (Caseinhydrolysat), 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1000 ml mit Aqua dest auffüllen, pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren 12,5 ml 1 M MgCl ₂ , 12,5 ml 1 M MgSO ₄ , 20 ml 20 % (w/v) Glukose

B.9.2 Pflanzliche Zellkulturen

B5:

- 2 ml Na₂HPO₄ x H₂O-Stammlösung
- 20 ml KNO₃-Stammlösung
- 2 ml (NH₄)₂SO₄-Stammlösung
- 2 ml MgSO₄ x 7 H₂O-Stammlösung
- 1 ml CaCl₂ x 2 H₂O-Stammlösung
- 1 ml KI-Stammlösung
- 5 ml FeEDTA -Stammlösung
- 1 ml Vitamin-Stammlösung
- 10 ml 2,4-D-Stammlösung
- 20 g Sucrose
- auffüllen mit Aqua dest ad 1 l, pH 5,5 einstellen

B5⁺:

- wie B5, zusätzlich:
- 2 ml Kinetin-Stammlösung
- 200 mg Cystein
- 10 ml 2,4-D Stammlösung

Stammlösungen:

Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	75 g/l
KNO ₃	125 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	67 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	125 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	171 g/l
KI	0,75 g/l
FeEDTA	1390 mg FeSO ₄ x 7 H ₂ O und 1860 mg Na ₂ EDTA getrennt in Aqua dest. lösen und ad 500 ml auffüllen mit Aqua dest.
Spurenelemente	1120 mg MnSO ₄ x H ₂ O
	300 mg H ₃ BO ₃
	300 mg ZnSO ₄ x 7 H ₂ O

	25 mg NaMoO ₄ x 2 H ₂ O
	39 mg CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	25 mg CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	ad 1000 ml mit Aqua dest.
Vitamine	50 mg Nicotinsäure
	50 mg Pyridoxin- HCl
	50 mg Thiamin-HCl
	5000 mg myo Inosit
	ad 50 ml auffüllen mit Aqua dest.
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	50 mg in etwas Ethanol lösen und mit Aqua dest. ad 500 ml auffüllen
Kinetin	10 mg in 100 ml 0,1 N HCl lösen

Festmedien wurden analog mit 1 % Agar hergestellt.

B.10 Dünnschichtchromatographie

Platten:

Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck (Darmstadt)

Laufmittel:

- I: Chloroform/Ethylacetat: 2/1 (v/v)
- II: Chloroform/Methanol: 95/5 (v/v)
- III: *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol: 5/5/1 (v/v/v)
- IV: Toluol/Ethylacetat: 3/2 (v/v)

B.11 Geräte

Biofuge pico/Biofuge 13	HERAEUS Instruments (Osterode)
Bio Imager FLA-2000	Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)
	Software von Raytest (Straubenhardt)
Gene Quant	Pharmacia (Freiburg)
Julabo HC/F10 Wasserbad	Julabo (Seelbach)
MiniCycler Model PTC-150	Biozym (Hamburg)
Minifold I- SRc 96- Dot Blot	Schleicher & Schüll (Dassel)
1214 Rackbeta-Szintillationszähler	PerkinElmer, Wellesley, USA)
Robocycler Gradient 96	Stratagene (Amsterdam, NL)
Sorvall [®] RC 5C Plus Zentrifuge	DuPont (Newton, USA)
Sorvall [®] RMC14 Tischzentrifuge	DuPont (Newton, USA)
Spektralphotometer UV-1602	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Ultra Turrax [®] T25 basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Uni Equip Hybridisierungssofen 6/12	Uni Equip (Martinsried)
UP 200S Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher (Teltow)

C. Methoden

C.1 Suspensionskulturen

C.1.1 Anzucht der Zellen

Kalluskulturen von *A. majus* wurden aus Saatgut angelegt, das zuvor in 4 %iger Hypochloritlösung sterilisiert wurde. Unter Ausschluss von Licht wurden die Samen unter sterilen Bedingungen auf mit autoklaviertem Wasser getränktem Zellstoff zum Keimen gebracht. Die Hypokotyle wurden angeschnitten und unter sterilen Bedingungen im Dunkeln gehalten.

Nach der Bildung von Kallusgewebe wurde dieses in B5⁺-Medium (40 ml) suspendiert, bei 110 rpm geschüttelt und alle 7 Tage in neues Medium umgesetzt. Nach sechs Monaten wurden neue Suspensionskulturen aus dem Kallusgewebe erstellt. Die Suspensionskulturen wurden im Dunkeln bei 25°C und 110 rpm kultiviert.

C.1.2 Induktion

6 Tage alte Suspensionskulturen (40 ml) wurden durch Zusatz von 0,5-2 % (m/V) Hefeextrakt (Roth) bzw. 5 mg rohem Elicitor aus Zellwandfraktionen von *Phytophthora sojae* (früher *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, *Pmg*; Stammlösung 5 mg/ml) über eine Zeit von 2-6 h induziert. Die Kontrollen wurden nur mit Wasser ausgeführt. Für die Dot Blots wurde RNA aus Suspensionskulturen isoliert, die 0-9 h mit *Pmg* induziert waren.

C.1.3 Ernte und Lagerung

Induzierte und nicht-induzierte Zellsuspensionskulturen wurden zeitgleich geerntet. Das Medium wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe und einer Glasfilternutsche abgesaugt, die Zellen mit ca. 300 ml Wasser nachgewaschen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

C.2 Gewebe von Frischpflanzen

Frisch geerntetes Pflanzenmaterial (ca. 1,5-2 Monate nach Aussaat) wurde gründlich gereinigt und die zerkleinerten Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln getrennt voneinander in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

C.3 Aufschluss von pflanzlichen Zellen und Geweben

C.3.1 Aufschluss mit Polyclar

Eingefrorenes Pflanzengewebe/Suspensionskulturzellen (5 g) wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 25 ml Polyclar-Puffer (**B.8.1**) versetzt. Mit dem Ultra Turrax[®] (IKA Labortechnik, Staufen) wurde das Pflanzenmaterial 2 min bei 13000 rpm aufgeschlossen. Anschließend wurde 10 min bei 4°C und 16000 rpm zentrifugiert (SS34; Sorvall[®] RC 5C Zentrifuge; DuPont, Newton, USA). Der Überstand wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

C.3.2 Aufschluss mit Dowex/Quarzsand

Eingefrorene nicht-induzierte oder induzierte *A. majus* Zellen (5 g) wurden zu 10 ml Aufschlusspuffer (**B.8.1**) gegeben. Nach Zugabe von 5 g Dowex 1x2 (Serva) und 2,5 g Quarzsand wurden die Zellen in einem gekühlten Mörser aufgeschlossen. Die Zelltrümmer, Dowex und Quarzsand wurden durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 16000 rpm, 4°C, 15 min) entfernt und der Extrakt bei -70°C eingefroren.

C.4 Molekularbiologische Methoden

Nach Sambrook & Russel (2001) oder Firmenangaben wurden durchgeführt:

- Agarosegel-Elektrophorese von DNA
- Isolierung von Plasmid-DNA
- Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren
- Restriktionsendonukleasenverdau
- Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

C.4.1 Konzentration von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurenkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Doppelstrang-DNA ergibt eine A_{260} von 1 bei einer Konzentration von 50 μg DNA/ml in Wasser. Das zusätzlich ermittelte Verhältnis A_{260}/A_{280} gibt Aufschluss über Kontaminationen mit Protein. Der A_{260}/A_{280} -Quotient von DNA-Lösungen sollte mindestens 1,8 betragen.

C.4.2 Anzucht von *E. coli* XL1-Blue

LB-Medium (3 ml) wurde mit Zellen des XL1-Blue-Glycerolstocks angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der Vorkultur in 250 ml LB-Medium gegeben und bei 18°C und 250 rpm geschüttelt. Mit dem restlichen 1 ml der Vorkultur wurde eine 10 ml Starterkultur angesetzt und bei 37°C und 250-300 rpm inkubiert. Nach ca. 7-8 h wurde die OD_{600} des 250 ml Ansatzes gemessen und mit der Starterkultur auf 0,07-0,08 eingestellt. Über Nacht wurde ca. 18 Stunden bei 18°C und 250 rpm inkubiert bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 (Generationszeit: 6 h)

C.4.3 Herstellung kompetenter Zellen

Die 250 ml Kultur (OD_{600} ca. 0,6) wurde zunächst 10 min auf Eis belassen, dann 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 40 ml eiskaltem TB-Puffer (**B.8.2**) resuspendiert, 10 min auf Eis gelassen und wiederum 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 9,3 ml eiskaltem TB-Puffer und 0,7 ml DMSO resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Aliquots von 150 und 300 μl wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

C.4.4 RNA-Isolierung

C.4.4.1 Gesamt-RNA nach Methode 1 (Freiburger Methode)

Die Zellen aus der Suspensionskultur (200 mg) wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben und zu 1 ml auf 65°C erwärmtem Extraktionspuffer (**B.8.3**) gegeben. Nach kräftigem Vortexen wurden die Proben 2-3 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden sie für 5-10 min abgekühlt und zweimal mit 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die wässrige Oberphase abgenommen und mit ¼ Volumen 10 M LiCl versetzt. Die RNA wurde bei 4°C über Nacht gefällt und abzentrifugiert (4°C; 10000 rpm). Das Sediment wurde in 500 µl SDS (0,5 %) bei 65°C unter leichtem Schütteln gelöst und nochmals mit 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert. Der Überstand wurde mit doppeltem Volumen absoluten Ethanol versetzt und 2 h bei -20°C belassen. Nach dem Zentrifugieren (10000 rpm; 20 min) wurde das Sediment getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem Wasser gelöst. Zur Kontrolle der Reinheit wurde die Konzentration mittels UV-Spektrometrie bestimmt und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die isolierte RNA wurde sofort bei -70°C eingefroren und nach dem Auftauen sofort verwendet.

C.4.4.2 Gesamt-RNA nach Giuliano (Methode 2)

Die Gesamt-RNA wurde nach Giuliano *et al.* (1993) modifiziert aus Zellkulturen oder Pflanzenmaterial von *A. majus* L. isoliert.

Pro Ansatz wurden 500 µl Extraktionspuffer (**B.8.3**), 3,5 µl 2-Mercaptoethanol (0,7 %) und 400 µl mit Citrat-Puffer gesättigtes Phenol vorgelegt und auf Eis gehalten. In flüssigem Stickstoff gemörserte Suspensionskulturzellen (200 mg) bzw. eingefrorenes Frischpflanzenmaterial (200 mg) wurden hinzugegeben und durch Vortexen homogenisiert. Nach Zugabe von Chloroform (100 mg) wurden die Ansätze geschüttelt und 20 min auf Eis stehen gelassen. Der Überstand der Extraktion wurde nach dem Zentrifugieren (20 min; 4°C; 13000 rpm) abgenommen und das gleiche Volumen Isopropanol hinzugegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Ansätze 40 min auf Eis stehen gelassen. Danach wurde erneut zentrifugiert (30 min; 4°C; 13000 rpm), der Überstand verworfen und das Sediment in TE-Puffer, pH 7,5 (500 µl) vorsichtig auf Eis resuspendiert (ca. 60 min). Die Ansätze wurden mit absolutem Ethanol (100 µl) versetzt, auf Eis stehen gelassen (20 min) und zur Abtrennung von Polysacchariden zentrifugiert (10 min; 4°C; 10500 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und die RNA mit LiCl (1/3 Volumen; 8 molar) auf Eis (60 min) gefällt. Die Sedimente wurden abzentrifugiert (20 min; 4°C; 13000 rpm) und zweimal mit 500 µl 80 % Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung im Luftstrom wurden sie in je 50 µl sterilem Wasser resuspendiert. Mittels UV-Spektrometrie wurde die Konzentration der RNA bestimmt und die Qualität nach Auftrennung im Agarosegel geprüft.

C.4.4.3 poly(A)⁺-RNA

Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA oder aus Zellrohextrakten wurde mit dem Dynabeads mRNA DIRECT™ Kit von Dynal durchgeführt. Die Methode nutzt magnetische Partikel, die mit oligo (dT)₂₅ beschichtet sind. Nach Hybridisierung mit poly(A)⁺-RNA werden die Partikel magnetisch von der Lösung abgetrennt. Die Isolierung der poly(A)⁺-RNA erfolgte nach Herstellerangaben.

C.4.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA (isoliert nach Giuliano) wurde mittels der MMLV-Reversen Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus) von Promega (Mannheim) durchgeführt. Als Primer wurde ein oligo (dT)-Primer [(T)₃₀(AGC)(AGCT)] verwendet.

Es wurde Gesamt-RNA aus nicht-induzierten und induzierten (3-5 h) *A. majus* Zellen eingesetzt, um sowohl konstitutiv vorhandene als auch induzierbare OMTn mittels PCR erfassen zu können.

Der oligo (dT)-Primer (1 µl; 25 pmol) wurde zur Gesamt-RNA (5 µg) hinzugegeben und der Ansatz mit sterilem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 70°C (5 min) inkubiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe des Puffers (5 µl MMLV 5x reaction buffer) und der dNTPs (1,25 µl; 10 mM) wurde bei 42°C (2 min) inkubiert. Die Reverse Transkriptase (1 µl M-MLV (200 U/µl)) wurde zugegeben und der Ansatz bei 42°C (60 min) inkubiert.

C.4.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

C.4.6.1 Synthese von Oligonukleotiden

Alle im Laufe der PCR-Versuche eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersried) bezogen und auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt.

C.4.6.2 OMT-spezifische PCR

Diese PCR wurde einschließlich der Primer mit leichten Abänderungen nach Frick & Kutchan (1999) durchgeführt. Die Inkubationen (Volumen 50 μ l) enthielten 0,2 mM dNTP, 1,5-2,5 mM $MgCl_2$, 2,5 U Taq-Polymerase und je 1 μ M der Primer OMT1 (universe) und OMT5 bzw. 6 (reverse) in 1 x Polymerasepuffer:

OMT1: 5`- GTI GA(CT) GTI GGI GGI GGI ACI GGI GC -3`

OMT5: 5`-GGI GC(AG) TC(CT) TCI ATI AC(AG) TGI GG -3`

OMT6: 5`-CA(AG) TGI (GT)C(AG) TCI (GC)IC CA(AG) TC(AG) TG-3`

Von der aus Gesamt-RNA erstellten cDNA wurden 0,4-0,8 μ g verwendet.

Folgendes PCR-Programm wurde gewählt:

1 x	94°C	5 min	Denaturierung
30 x	94°C	0,5 min	Denaturierung
	40°C	1 min	Annealing
	72°C	1 min	Extension
1 x	72°C	5 min	Extension

Die Ansätze wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und Proben mit Banden richtiger Größe mit ihren überhängenden A-Nukleotiden in den Vektor pCR2.1 (TOPO-TA-Cloning Kit, Invitrogen, Leek, Niederlande) inseriert. Nach Ausplattieren wurden pro Transformation 18-24 Kolonien ausgestochen, über Restriktionsverdau analysiert (Sambrook & Russel, 2001 oder nach Angaben des Herstellers) und sequenziert.

C.4.6.3 RACE

Vollständige cDNA Sequenzen wurden aus den PCR-amplifizierten Sequenzen mit Hilfe verschiedener RACE-Methoden (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds) entwickelt.

C.4.6.3.1 3'-RACE

Die Verlängerung der cDNA-Fragmente in 3'-Richtung erfolgte durch reverse Transkription von Gesamt-RNA mittels der Superscript II Reversen Transkriptase (Invitrogen, Leek, Niederlande) und dem Adapter-Primer (AP) (**D.2.2; Tab. 3**). Dieser Primer hybridisiert durch sein d(T)₁₇-Ende mit dem poly(A)-Schwanz der mRNA. Zusätzlich enthält er einen Adapter aus 20 Basen, an den in einer zweiten PCR der AUAP (Abridged Universal Adapter Primer) (**D.2.2; Tab. 3**) bindet. Als genspezifische Primer (GSP) wurden Teilsequenzen (**D.2.2; Tab. 3**) aus den jeweiligen cDNA-Fragmenten gewählt.

Das Volumen der PCR-Amplifikationen betrug 50 µl. Die Inkubationen enthielten 0,2 mM dNTP, 1,5-2 mM MgCl₂, 2,5 U Taq-Polymerase und je 0,4 µM der Primer in 1 x Polymerasepuffer.

Eine PCR mit den folgenden Zyklusparametern wurde durchgeführt:

1x	3 min	94°C
30x	1 min	94°C
	1 min	53-64°C
	2 min	72°C
1x	7 min	72°C

Bei Vorliegen gemischter cDNA-Fragmente aus der PCR wurde eine „nested“ PCR mit den gleichen Zyklusparametern durchgeführt. Als Matrize dienten 2 µl der jeweiligen 1:100-Verdünnung der ersten PCR-Runde bzw. 2 µl einer cDNA-Lösung, die nach Auftrennung der zunächst amplifizierten cDNA im Agarose-Gel und Elution (Ultrafree-DA (Millipore, Schwalbach) erhalten wurde. Als Primer wurden wiederum der AUAP sowie eine Teilsequenz (**D.2.2; Tab. 3**) des PCR-Amplifikates, die näher zum 3'-Ende positioniert ist, verwendet.

Das PCR-Produkt wurde inseriert (Vektor pCR2.1; TOPO-TA-Cloning Kit, Invitrogen, Leek, Niederlande), die DNA präpariert und anschließend sequenziert.

C.4.6.3.2**5'-RACE mit A- und C-tailing**

Die Verlängerung der cDNA-Fragmente in 5'-Richtung wurde modifiziert nach Frohman *et al.* (1988) (*A-tailing*: Anhängen von dATPs) oder nach Protokollen der Firma Gibco (*C-tailing*: Anhängen von dCTPs) durchgeführt. Nach reverser Transkription von Gesamt-RNA mit einer Teilsequenz als genspezifischen Primer (**D.2.2; Tab. 4**) und der Superscript II Reversen Transkriptase (Invitrogen, Leek, Niederlande) wurden überschüssige Nukleotide und Primer-Moleküle aus dem Ansatz entfernt (PCR-Clean-up-Kit (Boehringer, Mannheim)). In der „*tailing*“-Reaktion wurden dATP- oder dCTP-Reste durch eine Terminale Desoxynukleotid Transferase (15 U) (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers an das 5'-Ende der cDNA als Anker geknüpft. In einer ersten PCR wurden 8-10 µl dieser Reaktion als Matrize verwendet und die cDNA mit dem jeweiligen auf den generierten C- bzw. A-Schwanz passenden Adapter Primer (Abridged Adapter Primer (AAP), *C-tailing* und oligo d(T) anchor, *A-tailing*) und einer Teilsequenz (**D.2.2; Tab. 4**) des jeweiligen PCR-Fragmentes, die näher zum 5'-Ende positioniert ist, amplifiziert. Bei Vorliegen gemischter cDNA-Fragmente aus der PCR wurde eine „*nested*“ PCR mit den gleichen Zyklusparametern durchgeführt. Als Matrize dienten 1 µl der jeweiligen 1:10-Verdünnung der ersten PCR (*C-tailing; A-tailing*) bzw. 1 µl einer cDNA-Lösung, die nach Auftrennung der zunächst amplifizierten cDNA im Agarose-Gel und Elution (Ultrafree-DA (Millipore, Schwalbach) erhalten wurde. Als Primer wurden wiederum der AAP (*C-tailing*) bzw. der PCR-Anker (*A-tailing*) sowie eine Teilsequenz (**D.2.2; Tab. 4**) des PCR-Amplifikates, die näher zum 5'-Ende positioniert ist, verwendet.

Die PCR-Inkubationen wurden mit 1-1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM des jeweiligen RACE-Primers bzw. GSP, 0,2 µM dNTP und 2,5 U Taq DNA Polymerase (Promega) und den beim 3'-RACE beschriebenen Zyklusparametern durchgeführt. Produkte mit einer Länge von 800-900 bp wurden inseriert (Vektor pCR2.1; TOPO-TA-Cloning Kit, Invitrogen, Leek, Niederlande), die DNA präpariert und sequenziert.

C.4.6.3.3**RLM-RACE**

Das RLM-RACE (**R**NA **L**igase-**M**ediated **R**apid **A**mplification of **c**DNA **e**nds) wurde mit dem GeneRacerTM-Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande) durchgeführt. Die Methode zielt darauf, dass nur noch vollständige mRNA (mit 5'-*cap*) als Matrize für das nachfolgende 5'-RACE vorliegt. Die Gesamt-RNA wird mit alkalischer Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) behandelt, wobei das 5'-Phosphat unvollständiger Transkripte erfasst wird. Intakte mRNA wird aufgrund ihrer 7-Methylguanosinkappe nicht verändert. Die CIP wird über eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließend die 7-Methylguanosinkappe mit saurer Pyrophosphatase (tobacco acid pyrophosphatase, TAP) entfernt. Es erfolgt erneut eine Phenol-Chloroform-Extraktion. In der resultierenden Lösung liegt nur noch diejenige RNA am 5'-Ende phosphoryliert vor, die aus intakter mRNA stammt. An dieses Phosphat wird mit T4-RNA-Ligase ein Adapter aus 44 bp geknüpft. Nach erneuter Phenol-Chloroform-Extraktion wird die reverse Transkription mit der Superscript II Reversen Transkriptase und dem GeneRACER oligo d(T) Primer ausgeführt. Es wurden zwei Runden von PCR-Amplifikationen durchgeführt. In der ersten PCR wurden 0,5 µl der cDNA mit dem jeweiligen GSP und dem GeneRacer 5'-Primer (**D.2.2; Tab. 5**) amplifiziert. Die Inkubation enthielt 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP, 0,2 µM GSP, 0,6 µM GeneRacer 5'-Primer und 2,5 U Taq-Polymerase in 1 x Polymerasepuffer.

Die Zyklusparameter waren wie folgt:

1x	2 min	94°C
5x	30 sec	94°C
	2 min	72°C
25x	30 sec	94°C
	30 Sec	60-68°C
	2 min	72°C
1x	7 min	72°C

Als Matrize für die „*nested*“ PCR wurden 1 µl des PCR-Amplifikates der ersten Runde und als Primer der GeneRacer 5´nested Primer (0,2 µM) sowie eine Teilsequenz des PCR-Amplifikates (0,2 µM), die näher zum 5´-Ende positioniert ist, verwendet (**D.2.2; Tab. 5**). Die Inkubation enthielt außerdem 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP und 2,5 U Taq-Polymerase 1 x Polymerasepuffer. Folgende Zyklusparameter wurden verwendet:

1x	2 min	94°C
25x	30 sec	94°C
	30 sec	60-68°C
	2 min	72°C
1x	10 min	72°C

Die entsprechenden Fragmente wurden in den Vektor pCR4-TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande) inseriert, die DNA präpariert und sequenziert.

C.4.7 Plasmidisolierung

C.4.7.1 Methode A

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 1,4 ml einer Bakterien-Übernachtskultur zentrifugiert (10000 rpm; 5 min). Das Sediment wurde in Lösung I (100 µl) (**B.8.4**) resuspendiert und die Zellen mit 200 µl Lösung II (**B.8.4**) auf Eis (10 min) aufgeschlossen. Durch Zugabe von 150 µl Lösung III (**B.8.4**) wurden die Proteine in 20 min auf Eis gefällt. Nach Extraktion mit Phenol Chloroform (1:1) (450 µl) wurde zentrifugiert (13000 rpm; 10 min), die wässrige Phase abgenommen und die DNA mit absolutem Ethanol (750 µl) gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit Ethanol 70% (600 µl) gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Das Sediment wurde in TE-Puffer pH 8,0 (15 µl) gelöst und durch Restriktionsverdau und Auftrennung im Agarosegel analysiert.

Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde aus 25 ml einer Übernachtskultur gewonnen. Die Bakterien wurden zentrifugiert, in 1,5 ml Lösung I (**B.8.4**) suspendiert und mit 166 µl Lysozym (10 mg/100 µl) versehen. Nach 15 min bei Raumtemperatur (RT) wurden 3,3 ml Lösung II (**B.8.4**) zugegeben und der Ansatz auf Eis gestellt (10 min). Durch Zugabe von 2,5 ml Lösung III (**B.8.4**) wurden die Proteine in 20 min auf Eis gefällt und anschließend zentrifugiert (10000 rpm; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde mit 7,5 ml Phenol Chloroform (1:1) extrahiert und bei RT zentrifugiert (10000 rpm; 10 min). Zur Fällung der DNA wurde die Oberphase mit absolutem Ethanol (15 ml) versehen und bei RT 15 min stehen gelassen. Anschließend wurde zentrifugiert (10000 rpm; 15 min), das Sediment in 1,4 ml TE-Puffer pH 8,0 gelöst und auf 2 Eppendorfgeläße verteilt. Die RNA wurde 1h mit 10 µl RNase (10 mg/ml) verdaut. Mit 700 µl Phenol Chloroform (1:1) wurde extrahiert und anschließend zentrifugiert (13000 rpm; 10 min). Die DNA wurde aus dem Überstand mit 3 M Natriumacetat pH 6,0 (1/10 Vol.) und absolutem Ethanol (1 Vol.) bei -70°C für mindestens 1 h gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C wurde das Sediment mit Ethanol 70% gewaschen und getrocknet. Auch hier erfolgte die Analyse über einen Restriktionsverdau und Auftrennung im Agarosegel. Zusätzlich wurde die Konzentration durch UV-Absorption bestimmt.

C.4.7.2 Methode B

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 2 ml einer Bakterien-Übernachtskultur zentrifugiert (10000 rpm; 5 min) und in 150 µl GTE-Puffer (**B.8.4**) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung (**B.8.4**) wurde gemischt und der Ansatz 5 min auf Eis belassen. Anschließend wurden 150 µl PAS-Lösung (**B.8.4**) zugegeben und die Proteine in 10 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation (13000 rpm; 15 min) wurde der Überstand mit 1 ml absolutem Ethanol versetzt und die DNA in 2 min bei Raumtemperatur gefällt. Das durch Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) erhaltene DNA-Sediment wurde mit 1 ml Ethanol 70 % gewaschen, getrocknet und in 25-50 µl TE-Puffer pH 8,0 resuspendiert.

Außerdem wurde die Plasmid-DNA mit verschiedenen kommerziellen Reaktionssätzen nach den jeweiligen Herstellervorschriften isoliert.

C.4.8 Sequenzanalysen

Die Sequenzierung von cDNA erfolgte mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977). Alle DNA-Sequenzierungen wurden von Herrn Dr. Zauner (Fachbereich Biologie, Abteilung Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg) und MWG Biotech (Ebersried) durchgeführt.

Sequenzvergleiche von DNA- und Proteinsequenzen erfolgten mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> und http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html). Die Vergleiche mit den Gen-Datenbanken wurden mit den Programmen WU-Blast2 (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>) und Megablast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt.

C.4.9 Northern-Analyse

Die nach (C.4.4) isolierte Gesamt-RNA wurde in Lösung photometrisch sowie im Agarosegel zur Ladekontrolle quantifiziert. Dazu wurden 4 µg Gesamt-RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Bioimager (Fuji Photo Film; Tokyo, Japan) erneut vermessen. Die zweite Quantifizierung ist erforderlich, da die Messungenauigkeiten bei einer alleinigen Auswertung mit dem UV-Spektrometer zu groß waren. Jeweils 4 µg RNA wurden pro Ansatz in einem Volumen von 30 µl (2,2 M Formaldehyd, 50 % Formamid, 0,5 x MOPS-Puffer pH 7,0 (B.8.5)) denaturiert (68°C; 15 min), anschließend 5 min auf Eis gehalten und mit 30 µl eisgekühltem 20 x SSC (B.8.5) versetzt.

Das Blotting wurde mit der Minifold I-SRC 96-Dot Blot-Apparatur von Schleicher & Schüll (Dassel) durchgeführt. Die Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences, Braunschweig) wurde zunächst in bidestilliertem Wasser hydriert und anschließend in 10 x SSC geschüttelt. Das verwendete Whatman-Papier (Whatman, Banbury, UK) wurde ebenfalls in 10 x SSC geschwenkt. Der weitere Aufbau der Dot Blot Apparatur erfolgte nach Angaben des Herstellers. Mittels Vakuum wurden die Proben auf die Membran transferiert. Anschließend wurde mit 30 µl 10 x SSC nachgespült und die RNA auf der Membran fixiert (2 h bei 80°C).

Die Prähybridisierung erfolgte bei 68°C in 2 x Denhardt's (B.8.5), 5 x SSC, 0,1 % SDS und 100 µg/ml Heringsperma-DNA für drei Stunden.

Die Markierung von DNA als Sonden wurde mit dem „Rediprime™ II-random prime labeling system“ (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) und [α -³²P] dCTP (ICN, Meckenheim) durchgeführt. Der Einbau der markierten Nukleotide erfolgte in einer DNA Polymerase-Reaktion an ausgewählter cDNA als Matrize. Über eine Sephadex G-50 Säule wurde die markierte DNA von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt und die besten Fraktionen mit dem Szintillationszähler (B.11) ermittelt.

Die radioaktiv markierte Sonde in TE-Puffer pH 8,0 wurde denaturiert (95°C; 5 min) und zur Hybridisierungslösung und den Membranen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 68°C. Die Membranen wurden mit 2 x SSC gewaschen (20 min; RT) und die quantitative Auswertung mit dem Bioimager wie unten beschrieben durchgeführt. Bei unspezifischer Bindung der Sonde auf der Membran wurde nach der ersten Auswertung ein zweites Mal gewaschen. Dies geschah mit 2 x SSC bei 68°C für 15 min. Die quantitative Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

C.4.10 Mutagenese

Vor der Mutagenese wurde der Mutageneseprimer (D.5.1; Tab. 10) mit ATP am 5'-Ende phosphoryliert. Die Inkubationen (20 µl) enthielten 400 ng des jeweiligen Primers, 1 mM ATP (10 mM Stammlösung) und 10 U T4 Polynukleotidkinase in 1 x Polynukleotidkinasepuffer. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 1 h.

Restriktionsstellen wurden in die cDNA eingefügt oder aus dieser entfernt mit dem QuikChange® „Multi Site Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg). Im Gegensatz zu älteren Mutageneseverfahren, die von der Einzelstrang-DNA ausgehen, wird als Matrize der Plasmid-Doppelstrang verwendet. Das Prinzip der Mutagenese beruht auf PCR-Technik. Die Inkubationen der PCR (25 µl Volumen) setzten sich aus 100 ng des phosphorylierten Primers (D.5.1; Tab. 10), 50 ng des Templates, 1 µl des mitgelieferten dNTP Mixes und

2,5 U der mitgelieferten PfuTurbo® DNA Polymerase in 1 x Polymerasepuffer zusammen. Folgendes Programm wurde verwendet:

1x	1 min	95°C
30x	1 min	95°C
	1 min	55°C
	8 min	65°C

Nach der PCR erfolgte ein *DpnI*-Verdau, durch den spezifisch methylierte und semimethylierte DNA verdaut wird. Die anschließende Transformation in *E. coli* XL 10-Gold wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde nach der Transformation präpariert und sequenziert.

C.4.11 Heterologe Expression

C.4.11.1 Vorbereitung der Sequenzen

In die vollständigen cDNA Sequenzen wurden mit PCR und speziellen Primern (**D.5.1; Tab. 9**) am Start-ATG eine *NcoI*-Schnittstelle und hinter dem Stopkodon eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt. Die Inkubationen (50 µl) in 1 x Polymerasepuffer enthielten 0,2 mM dNTP, 0,9 mM MgCl₂, 1,75 U Expand High Fidelity Taq-Polymerase, 400 ng „*template*“ und je 0,4 µM der Primer (**D.5.1; Tab. 9**). Um einen fehlerfreien Aufbau der DNA-Stränge zu gewährleisten, wurde mit dem Expand High Fidelity System (Roche Diagnostics, Mannheim) gearbeitet. Das mitgelieferte DNA-Polymerasen-Gemisch besteht aus einer Taq-Polymerase und einer „*proofreading*“ Polymerase mit 3′-5′-„*proofreading*“ Aktivität. Eine PCR mit den folgenden Zyklusparametern wurde durchgeführt:

1x	3 min	94°C
30x	1 min	94°C
	1 min	53-64°C
	2 min	72°C
1x	7 min	72°C

Produkte mit einer Länge von 750-1100 bp wurden in den Vektor pCR4 (TOPO-TA-Cloning Kit; Invitrogen, Leek, Niederlande) kloniert, die DNA präpariert und sequenziert. Im translatierten Bereich vorhandene *NcoI*-Schnittstellen wurden mittels einer Mutagenese-PCR (**C.4.10**) unter Beibehaltung des Leserasters entfernt.

C.4.11.2 Klonierung in den Expressionsvektor

Ca. 20 µg der cDNA-pCR4-Konstrukte und des Expressionsvektors pQE60 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI* nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas; St. Leon-Rot) über Nacht geschnitten. Die Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mittels DNA-Extraktionssätzen (QIAEX II, Qiagen, Hilden; Nucleo Trap, Macherey & Nagel, Düren) isoliert. Das Vektor/Insert-Verhältnis wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Menge an Vektor [ng]} \times \text{Basenlänge des Inserts [kb]}}{\text{Basenlänge des Vektors [kb]}} \times \text{Molares Insert/Vektor-Verhältnis}$$

Es wurden immer 100 ng Vektor verwendet, das molare Verhältnis Insert/Vektor war 3/1. Die Inkubationen waren wie folgt zusammengesetzt:

DNA-Fragment	x µl
pQE60-Vektor	y µl
10 x Ligationspuffer	2 µl
50 % PEG 4000 Lösung	2 µl
T4 DNA Ligase (5 U)	1 µl
Destilliertes Wasser	ad 20 µl

Ligationszeiten und-temperaturen wurden den Angaben der Hersteller (MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Roche Diagnostics, Mannheim) entnommen. Ein Aliquot (3 µl) der Ligationsansätze wurden anschließend mit 100 µl kompetenten *E.coli*-XL1 blue (C.4.3) zusammengegeben und der Ansatz auf Eis gestellt (30 min). Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 1 min wurde der Ansatz 2 min auf Eis gestellt. 900 µl LB-Medium wurden hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Suspensionen wurden auf Agarplatten (LB-Medium, amp (100 µg/ml Medium)) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde präpariert und sequenziert.

C.4.11.3 Transformation von M15[pREP4]

Die Expression der rekombinanten Enzyme wurde im pQE60/M15[pREP4]-System durchgeführt. Durch die bereits oben beschriebene Insertion der DNA-Fragmente in die *NcoI*-Schnittstelle des Expressionsvektors pQE60 ist die Expression der OMTn vom vektoreigenen Start-ATG möglich. Ca. 3 µg präparierte DNA wurde mittels 1-Minuten-Transformation (Golub, 1988) in 5 µl *E.coli* M15 transformiert.

C.4.11.4 Induktion von transformierten M15

Das über IPTG regulierbare Promotor/Operator-Element des pQE60 Vektors besteht aus einem T5-Promotor des *E. coli* Phagen T5 und zwei lac-Operator Sequenzen. Daran schließt sich eine synthetische Ribosomenbindungsstelle zur effizienten Translation an. Der Promotor unterliegt zudem einer strengen Regulation durch den lacI-Repressor, der bei *E. coli* M15[pREP4] auf dem in hoher Kopienzahl vorhandenen Vektor pREP4 kodiert wird. Nach der Transformation von *E. coli* M15[pREP4] mit den pQE60-Konstrukten wurden die Bakterien in LB-Medium mit Ampicillin (amp) (100µg/ml) und Kanamycin (kan) (25 µg/ml) zur Selektion auf pREP4 über Nacht bei 37°C angezogen.

Zur ersten Überprüfung auf Enzymaktivität wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben 25 ml frisches LB-Medium (amp/kan) mit 1/100 Volumen dieser Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht war. Für die Reinigung und biochemische Charakterisierung wurde, um eine ausreichende Menge an OMT-Proteinen zu erhalten, in 2 l Schikanekolben mit 400 ml Medium analog verfahren. Die Induktion erfolgte mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM über 3 Stunden unter gleichen Bedingungen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (SS34-Rotor bei 25 ml Ansätzen; 16000 rpm, 4°C, 10 min / SLA3000-Rotor bei 400 ml Ansätzen; 6000 rpm, 4°C, 10 min) und bei -70°C eingefroren.

Das Sediment der Kultur wurde in 2 ml (bei 25 ml Kultur) oder 20 ml (bei 400 ml Kultur) 70 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 mit 10 mM EDTA aufgenommen und 30 bzw. 90 sec unter Eiskühlung im Ultraschall Sonifier (Cycle 0,6; 100%) beschallt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 16000 rpm, 4°C, 10 Minuten) entfernt.

C.5 Biochemische Methoden

C.5.1 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

C.5.1.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden modifiziert nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Sandermann & Strominger, 1972; Bensadoun & Weinstein, 1976) durchgeführt. Das Protein wurde zunächst durch Zugabe von 24 %iger Trichloressigsäure in Gegenwart von Natriumdesoxycholat gefällt. Als Standard wurde BSA in einer Menge von 5 bis 40 µg verwendet.

C.5.1.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde als „slab“-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Herstellung des Trenngels (12,5 %ig)

4,1 ml	30 % wässrige Acrylamid-Lösung
400 µl	10 % SDS in Wasser
2,5 ml	Trenngelpuffer (B.8.6)
3,0 ml	H ₂ O
16 µl	TEMED
50 µl	10 % Ammoniumpersulfat in Wasser (APS)

Herstellung des Sammelgels (5 %ig)

375 µl	30 % wässrige Acrylamid-Lösung
100 µl	10 % SDS in Wasser
625 µl	Sammelgelpuffer (B.8.6)
1,4 ml	H ₂ O
5 µl	TEMED
15 µl	10 % Ammoniumpersulfat in Wasser (APS)

Die Elektrophorese wurde in einer „slab“-Gel Miniprotean II 2D Multicell Apparatur (Biorad, München) durchgeführt. Das Trenngel wurde in die Apparatur auf ca. 2/3 Höhe eingefüllt und sofort mit Butanol/H₂O überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde die alkoholisch-wässrige Phase abgegossen, das Sammelgel aufgefüllt und der Probenkamm vorsichtig eingesteckt.

Zur Denaturierung der Proteine wurden 20 µl Probe zusammen mit 5 µl Probenpuffer (**B.8.6**) unter Zusatz von DTT (5 mM) 5 min auf 95°C erhitzt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V im Puffersystem (**B.8.6**) für ca. 1 h.

Die Gele wurden der Apparatur entnommen und die Proteine durch Coomassie Brilliant Blue R 250 (**B.8.6**) angefärbt. Nach 10-20 min wurden die Gele mit Entfärberlösung (**B.8.6**) entfärbt.

Zur Kalibrierung wurde der SDS-7-Standard von Sigma verwendet mit den Proteinen:

Rinderserumalbumin	66 kDa
Ovalalbumin	45 kDa
Carboanhydrase	36 kDa
Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	29 kDa
Trypsinogen	24 kDa
Trypsininhibitor	20 kDa
α -Lactalbumin	14,2 kDa

C.5.1.3 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die Rohextrakte aus induzierten Bakterienzellen wurden einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (0-30 %, 30-45 %, 45-60 %, 60-80 % Sättigung) unterzogen. Zur Fällung wurde festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unter Rühren auf Eiswasser langsam innerhalb 10-15 min zugegeben und 20-30 min rühren gelassen. Präzipitiertes Protein wurde abzentrifugiert (SS34-Rotor, 16000 rpm, 4°C, 10 min) und im Puffer für den Enzymtest (C.5.2.1 + 3) resuspendiert. Alle Fraktionen wurden auf Enzymaktivität untersucht.

C.5.2 Enzymtests

C.5.2.1 Test auf BMT-Aktivität

Rohextrakte aus Zellkulturen (native BMT) und Extrakte mit rekombinanter BMT wurden modifiziert nach Hauffe *et al.* (1986) auf Aktivität getestet. Die Inkubationen (Volumen 200 μl (Zellkulturrohextrakt) bzw. 100 μl (Bakterienrohextrakt); bei 40°C für 1 h) in 200 mM Kaliumphosphat pH 8,0 enthielten 40 μM *S*-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]-methionin, 250 μM Bergaptol, 20 mM Natriumascorbat, 1,5 mM Magnesiumchlorid und 14,5-19,8 μg (native BMT) bzw. 93 μg Protein (aus transformierten Bakterien). Inkubationsansätze mit denaturiertem Protein (5 min; 95°C) oder fehlendem Substrat bzw. Protein wurden zur Kontrolle getestet. Die Reaktionen wurde mit 30 μl 1 N HCl gestoppt. Anschließend wurde mit doppeltem Volumen Ethylacetat extrahiert. Das halbe Volumen davon wurde mit 5 ml Szintillationscocktail (Roth, Karlsruhe, Germany) versetzt und im Szintillationszähler (1214 Rackbeta; PerkinElmer, Wellesley, Massachusetts, USA) vermessen.

C.5.2.2 Test auf XMT-Aktivität

Die XMT-Aktivität von Rohextrakten aus Zellkulturen (Volumen 200 μl) wurde in 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 in Gegenwart von 40 μM *S*-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]-methionin, 200 μM Xanthotoxol, 20 mM Natriumascorbat und 1,5 mM Magnesiumchlorid gemessen. Die Inkubationen wurden mit 14,5-19,8 μg Protein aus Rohextrakten gestartet und bei 35°C für 1 h durchgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach dem des BMT Standard-Enzymtests.

C.5.2.3 Test auf COMT-Aktivität

Die COMT-Aktivität von Extrakten aus Zellkultur oder transformierten Bakterien wurde modifiziert nach Hauffe *et al.* (1986) durchgeführt. Die Inkubationen (Volumen 200 μ l (Zellkulturrohextrakt) bzw. 100 μ l (Bakterienrohextrakt); bei 35°C für 1 h) in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 enthielten 40 μ M *S*-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin, 250 μ M Kaffeesäure, 20 mM Natriumascorbat, 1,5 mM Magnesiumchlorid und 14,5-19,8 μ g Protein (native COMT) bzw. 94 μ g Protein (aus transformierten Bakterien). Das weitere Vorgehen entsprach dem des BMT Standard-Enzymtests.

C.5.2.4 Test auf CCoAOMT-Aktivität

Rohextrakte aus Zellkulturen (native CCoAOMT) und Extrakte mit rekombinanter CCoAOMT wurden auf Aktivität getestet. Die Inkubationen (Volumen 200 μ l (Zellkulturrohextrakt) bzw. 100 μ l (Bakterienrohextrakt); bei 30°C für 30 min) in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 enthielten 40 μ M *S*-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin, 25 μ M Caffeoyl-CoA, 20 mM Natriumascorbat, 1,5 mM Magnesiumchlorid und 7,25-9,88 μ g (native CCoAOMT) bzw. 87 μ g Protein (aus transformierten Bakterien). Als Variation wurde der Enzymtest ohne Magnesiumchlorid bei sonst gleicher Zusammensetzung durchgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach dem des BMT Standard-Enzymtests.

C.5.3 Gelpermeations-Chromatographie (GPC) an Fractogel EMD BioSEC (S)

Die Chromatographie wurde an einer Superperformance-Säule (600 x 16 mm; Gelbettvolumen 117 ml), die mit Fractogel EMD Bio SEC (Merck, Darmstadt) gefüllt war, durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein makroporöses partikuläres Polymethylacrylat (Partikelgröße 20-40 μ m, Porengröße 500-800 Å), hydrophilisiert durch Umsetzung mit Diethylenglykol, dessen Oberfläche mit aufgepfropften Linerpolymeren aus Methoxyethylacrylamid belegt ist. Der Fraktionierbereich dieser Säule liegt zwischen 5 und 1000 kDa.

Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumen Puffer (**B.8.7**) bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Die Proteinlösung aus der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurde direkt auf die Säule gegeben und mit 1 ml/min eluiert. Aliquots (5 μ l) der Fraktionen dienten zur Messung der Enzymaktivität in 100 μ l-Inkubationen.

Die analytische GPC wurde auf der gleichen Säule, die mit Referenzproteinen (Gel Filtration LMW Calibration Kit; Amersham Biosciences, Braunschweig) kalibriert wurde, durchgeführt:

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht [kDa]</u>
Alkoholdehydrogenase	150
Rinderserumalbumin (BSA)	67
Ovalbumin	45
Carboanhydrase	25
Ribonuklease A	13,7

Zur Konzentrierung wurde das Protein mit Ammoniumsulfat (-80 % Sättigung) aus 20 ml gefällt, abzentrifugiert (SS34-Rotor; 16000 rpm, 10 min, 4°C) und das Sediment in 100 µl Elutionspuffer (**B.8.7**) aufgenommen.

Das Ausschlussvolumen (40 ml) wurde mit Dextranblau 2000 (Amersham Biosciences, Braunschweig) bestimmt. Die Elution der Eichproteine und von BMT oder COMT wurde durch Absorption bei 280 nm bzw. durch Messung der Enzymaktivitäten verfolgt. Die apparenten Molekulargewichte von BMT und COMT wurden in mehrfacher Wiederholung über die relativen Retentionsvolumina (K_{av} -Werte) bestimmt.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

K_{av} = Verteilungskoeffizient
 V_e = Elutionsvolumen des Proteins
 V_o = Ausschlussvolumen
 V_t = Gelbettvolumen

C.5.4 Stabilität der BMT

Heterolog exprimierte BMT wurde durch Ammoniumsulfatfällung fraktioniert, in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM DTT aufgenommen und über PD-10-Säulen (Amersham Biosciences, Braunschweig) entsalzt. Aliquots wurden bei RT, 4°C, -20°C mit/ohne Einfrieren in flüssigem Stickstoff und -70°C mit/ohne Einfrieren in flüssigem Stickstoff gelagert. Die bei RT und 4°C gelagerten Proben wurden nach 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 und 240 h, die übrigen Proben nach 3, 6, 12, 24 und 240 h sowie nach einem und 4 Monaten auf ihre Aktivität überprüft. Das bei -20°C bzw. -70°C gelagerte Enzym wurde zudem mehrmals aufgetaut und eingefroren. Zum Enzymtest (**C.5.2.1**) wurden 1,5 µg Protein in einem Inkubationsvolumen von 100 µl bei 35°C eingesetzt.

C.5.5 Charakterisierung der nativen und rekombinanten Enzyme

C.5.5.1 pH-Abhängigkeit

Die Aktivitäten der nativen BMT und XMT wurden in 200 mM Puffer von pH 4,5 bis 10,0 überprüft:

<u>Puffer</u>	<u>pH</u>
Natriumacetat	4,5-5,5
Bis-Tris-HCl	6,0-7,0
Imidazol	6,0-7,0
Kaliumphosphat	5,5-8,0
Tris-HCl	7,5-9,0
Natriumglycinat	8,5-10,0

Die Inkubationen (200 µl Gesamtvolumen) wurden mit 14,5-19,8 µg Protein bei 40°C (BMT) und 35°C (XMT) in Gegenwart von 40 µM *S*-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin, 20 mM Natriumascorbat, 1,5 mM Magnesiumchlorid und 250 µM Bergapton oder 200 µM Xanthotoxol durchgeführt. Die Inkubationszeiten lagen im linearen Bereich.

Die pH-Abhängigkeiten der rekombinant exprimierten BMT und COMT wurden in 200 mM Puffer von pH 4,0 bis 10,0 überprüft:

<u>Puffer</u>	<u>pH</u>
Natriumacetat	4,0-5,5
Bis-Tris-HCl	6,0-7,0
Kaliumphosphat	5,0-8,0
Tris-HCl	7,0-8,5
Natriumglycinat	8,5-10,0

Die Inkubationen (100 µl Gesamtvolumen) wurden mit 1,5 µg (BMT) bzw. 5,1 µg Protein (COMT) bei 35°C in Gegenwart von 40 µM *S*-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin, 1,5 mM Magnesiumchlorid und 250 µM Bergapton oder Kaffeesäure durchgeführt.

C.5.5.2 Temperatur

Die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von nativer BMT bzw. XMT wurden bei 20, 25, 30, 32, 35, 37 und 40°C, die der rekombinanten BMT bzw. COMT bei 15, 20, 25, 28, 30, 32, 35, 38, 40, 42, 44, 45, 46 und 50°C gemessen. Die Zusammensetzung der Inkubationen entsprach den Vorgaben des Tests auf pH-Abhängigkeit. Die Inkubationen wurden durchgeführt in Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 (native BMT: 100 mM; rekombinante BMT: 200 mM), pH 7,5 (native XMT: 100 mM) oder pH 7,0 (rekombinante COMT: 200 mM).

C.5.5.3 Sonstige Parameter für die rekombinante BMT und COMT

Alle Bestimmungen wurden in einem Volumen von 100 µl unter linearen Bedingungen (Zeit/Proteinmenge) durchgeführt.

Zeitlinearität

Die Zeitlinearität wurde bis 90 Minuten bei 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75 und 90 min gemessen. Die Inkubationen (Volumen 100 µl) bei 40°C (BMT) bzw. 32°C (COMT) in 200 mM Kaliumphosphat pH 8,0 (BMT) bzw. pH 7,0 (COMT) enthielten 40 µM *S*-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin, 250 µM Bergaptol oder Kaffeesäure, 1,5 mM Magnesiumchlorid und 0,9 µg (rekombinante BMT) bzw. 3,0 µg Protein (rekombinante COMT).

Proteinlinearität

Die Inkubationen (Volumen 100 µl) zur Bestimmung der Proteinlinearität wurden in 200 mM Kaliumphosphat pH 8,0 (BMT) bzw. pH 7,0 (COMT) bei 40°C (BMT) bzw. 32°C (COMT) in Gegenwart von 40 µM *S*-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin, 250 µM Bergaptol oder Kaffeesäure, 1,5 mM Magnesiumchlorid und 0,15-3,0 µg (rekombinante BMT) oder 0,5-10,0 µg Protein (rekombinante COMT) durchgeführt.

Metallabhängigkeit

Die Enzymaktivitäten wurden in Gegenwart von gesättigter EDTA-Lösung (5 % des Ansatzvolumens) ohne MgCl₂ oder 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 500 µM, 1,5 mM und 5 mM MgCl₂ gemessen. Die Inkubationsansätze waren identisch mit den im Test auf Zeitlinearität beschriebenen Ansätzen.

Zusätzlich wurden die Effekte von Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ und Zn²⁺ in einer Endkonzentration von 0,1 µM und 1,5 mM gemessen. Die Inkubationsansätze waren im Weiteren identisch mit den im Test auf Zeitlinearität beschriebenen Ansätzen mit Ausnahme der eingesetzten Proteinmenge (1,5 µg (BMT) bzw. 5,1 µg (COMT)).

Substrate

Zur Bestimmung der Substratspezifitäten wurden als mögliche Substrate in einer Endkonzentration von 250 μM eingesetzt:

Bergapton, Xanthoxol, Psoralen, Umbelliferon, Daphnetin, Esculetin, Kaffeesäure, 5-Hydroxy-Ferulasäure, Kaffeesäuremethylester, 4-Cumarsäure, Hydrokaffeesäure, (+)- und (-)-Catechin, (+)- und (-)-Epikatechin, Kämpferol, Dihydrokämpferol, Apigenin, Quercetin, Sinapinsäure und Naringenin. Außerdem wurde 25 μM Caffeoyl-CoA eingesetzt.

Die Inkubationsansätze waren im weiteren identisch mit den im Test auf Metallabhängigkeit beschriebenen Ansätzen.

C.6 Sonstiges

C.6.1 Radioaktivmessungen

Die quantitative Bestimmung von radioaktiven Substanzen (Enzymprodukte nach Extraktion oder auf Dünnschichtplatten, Northern „dot blots“ und Sonden) erfolgte durch Szintillationszählung (1214 Rackbeta; PerkinElmer, Wellesley, Massachusetts, USA) oder mit einem Bio Imager FLA-2000 von Fuji Photo Film (Tokyo, Japan) und der Software von Raytest (Straubenhardt).

D. Ergebnisse

Ammi majus L. ist bekannt für seine relativ hohen Gehalte an Psoralenen (Ekiert & Gomolka, 2000). Dies ist möglicherweise einer der Gründe, warum sich diese Pflanze weltweit und unerwünscht (Unkraut im Weideland der USA) durchsetzen konnte.

Die Furanocumarinbiosynthese wird von einer Vielzahl membrangebundener und löslicher Enzyme katalysiert. Als membrangebundene Enzyme konnten aus *A. majus* L. bereits eine C₆-Prenyltransferase (Hamerski *et al.*, 1990b) sowie die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen Marmesin-Synthase (Hamerski & Matern, 1988a), Psoralen-Synthase (Hamerski, 1989), Psoralen 5-Monooxygenase (Hamerski & Matern, 1988b) und Zimtsäure 4-Hydroxylase (Hübner *et al.*, 2003) beschrieben werden. Letztere wurde bereits in ihrer cDNA- und Proteinsequenz aufgeklärt und biochemisch charakterisiert.

Die Bergapto- und Xanthotoxol *O*-Methyltransferasen stellen lösliche Enzyme dar. Sie katalysieren die Methylierungsreaktionen zu Bergapten und Xanthotoxin. Beide OMTn wurden bereits aus *P. crispum* L. (Hauffe *et al.*, 1986) und *R. graveolens* L. (Sharma *et al.*, 1979) gereinigt und aus *P. crispum* L. charakterisiert. Dennoch sind ihre DNA- und Aminosäuresequenzen bislang nicht publiziert worden. Auf eine starke Ähnlichkeit der BMT von *P. crispum* zu heterologen COMTn wurde hingewiesen (Ibrahim *et al.*, 1998).

D.1 Enzymatische Voruntersuchungen

D.1.1 Induktion von BMT und XMT in *Ammi majus* Zellkultur

Die Induzierbarkeit der Furanocumarinbiosynthese durch *Pmg*-Elicitor und Hefeextrakt wurde an Zellkulturen von *A. majus* und *P. crispum* bereits eingehend untersucht (Wendorff & Matern, 1986; Hamerski & Matern, 1988a, b). Zur gezielten Klonierung von OMTn dieser Biosynthese erfolgten Aktivitätsmessungen aus unterschiedlich lang induzierten Suspensionszellkulturen zur Ermittlung der Induktionsmaxima der Enzyme. Über diese Maxima können Rückschlüsse auf optimale Induktionszeiten für die RNA-Isolierung gezogen werden.

Aus dem Kallusgewebe von *A. majus* L. wurden monatlich neue Suspensionskulturen angesetzt, da die Zellen bei längerer Kultivierung eine Braunfärbung entwickeln und auch abgeschwächer auf die Behandlung mit Elicitoren reagieren (Hamerski, 1989).

Die Zellkulturen bilden im Dunkeln in B5⁺-Medium eine feine, annähernd weiß gefärbte Suspension. Das Zellfrischgewicht der Kulturen nahm innerhalb von 7 Tagen um das 3-4-fache zu, daher wurden die Zellkulturen wöchentlich propagiert, indem ca. 3 g Zellfrischgewicht in 40 ml frisches B5⁺-Medium überführt wurde.

In nicht-induzierten Zellen waren BMT und XMT nur schwach messbar (spezifische Aktivitäten: BMT: 407,2 nkat/kg; XMT: 66,2 nkat/kg). Daher wurden Zellkulturen nach 6 Tagen in Suspension für 2, 5, 8, 11, 14 und 23 h durch Zusatz von rohem Elicitor aus Zellwandfraktionen von *Phytophthora sojae* (früher *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, *Pmg*) induziert und die Aktivitäten von BMT und XMT verfolgt. Nach 5 h stieg die BMT-Enzymaktivität im Vergleich zur nicht induzierten Probe auf das 4-fache, nach 8 h auf das 6,7-fache an (**Abb. 18**). Danach nahm die Enzymaktivität kontinuierlich wieder ab und erreichte nach 23 h annähernd die Werte der nicht induzierten Proben. Analog zur BMT wurde die XMT auf ihre Induzierbarkeit mit dem rohen Elicitor getestet. Im Gegensatz zur BMT zeigt die XMT eine sehr geringe Ausgangsaktivität. Nach 5 h stieg die XMT-Enzymaktivität im Vergleich zur nicht induzierten Probe auf das 4,7-fache, nach 8 h auf das 13-fache und nach 11 h auf das 22-fache an. Danach nahm die Enzymaktivität kontinuierlich ab. Die XMT zeigt daher eine im Vergleich zur BMT stark erhöhte Induzierbarkeit. Im Vergleich zu *A. majus* zeigen die Enzyme in Zellkulturen von *P. crispum* deutlich spätere Aktivitätsmaxima von ca. 35 h bzw. 22 h (Hauffe *et al.*, 1986).

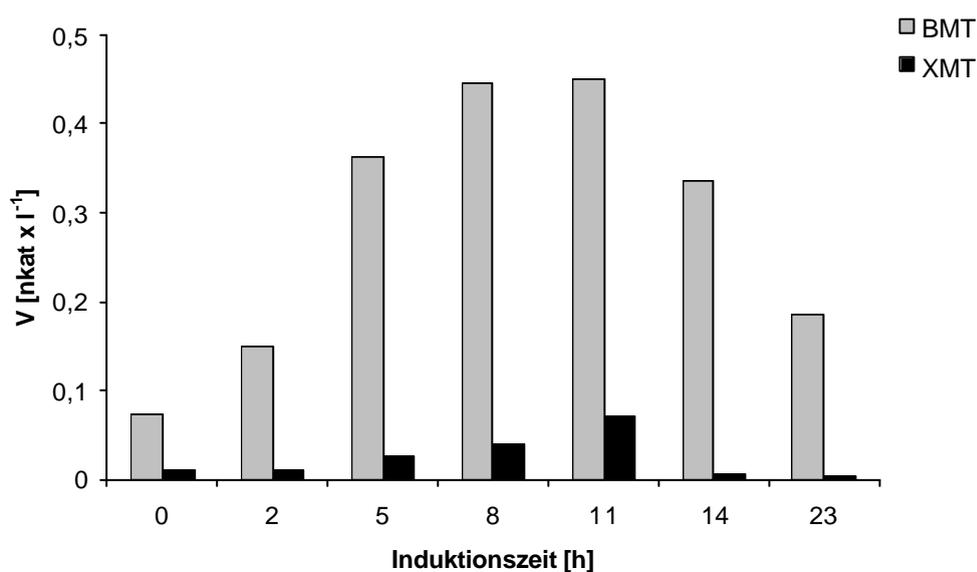


Abbildung 18: Aktivität von BMT und XMT nach Induktion mit *Pmg*-Elicitor

Die Tests wurden unter Standardbedingungen mit ca. 17,4 µg Protein bei 40°C in 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 (BMT) oder 35°C in Tris-HCl pH 7,5 (XMT) durchgeführt.

Für einige andere Systeme wurde die Induktion von Phytoalexinen durch Hefeextrakt beobachtet. Diese Induktion bietet den Vorteil, dass die Hefe kommerziell verfügbar ist. Daher wurden die Zellkulturen nach 6 Tagen in Suspension mit 0,5, 1 und 2 g Hefeextrakt für 8 h induziert. Mit 0,5 g Hefeextrakt konnte die BMT-Aktivität am deutlichsten auf das 1,6-fache gesteigert werden (**Abb. 19**). Die Induzierbarkeit fiel damit weit geringer aus als mit *Pmg* (6,7-fach erhöhte Aktivität nach 8 h Induktion). Die XMT zeigte keine Steigerung ihrer Aktivität.

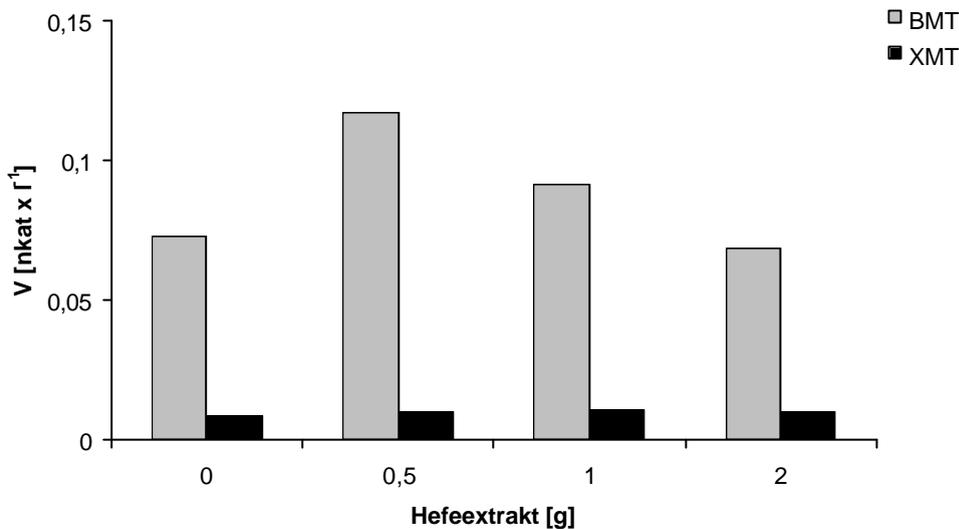


Abbildung 19: Aktivität von BMT und XMT nach Induktion mit Hefeextrakt

Die Tests wurden analog zu den Induzierungsversuchen mit *Pmg* durchgeführt.

D.1.2 Bestimmung der pH- und Temperaturabhängigkeit von BMT und XMT

D.1.2.1 pH-Abhängigkeit

Zur Messung der pH-Abhängigkeit der BMT- und XMT-Aktivität wurde ein Rohextrakt aus Zellen verwendet, die 8h mit *Pmg*-Elicitor induziert worden waren. Sechs Puffer waren erforderlich, um einen großen pH-Bereich (pH 4,5-10,0) abzudecken. Die Messungen wurden mit 17,4 µg Protein in 200 mM Puffer bei 35°C durchgeführt (**C.5.5.1**).

Das Optimum für die katalytische Umsetzung des Bergaptols zum Bergapten (BMT) lag bei pH 8,0 in Tris-Puffer, außerhalb dieses pH-Wertes nimmt die Aktivität stark ab (**Abb. 20**). Für die native BMT aus *P. crispum* wurde in Kaliumphosphatpuffer ebenfalls ein pH-Optimum bei pH 8 bestimmt (Hauffe *et al.*, 1986), für die BMT aus *R. graveolens* L. ein

breiterer Bereich von pH 7,3-8,0 in Tris-HCl (Thompson *et al.*, 1978). Die Umsetzung des Xanthotoxols zum Xanthotoxin zeigte höchste Werte im Bereich zwischen pH 6-7,5 in Kaliumphosphat (pH 6-7) bzw. in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) (**Abb. 21**). Für die native XMT aus *P. crispum* (Hauffe *et al.*, 1986) war ein Optimum im Bereich von pH 7,5-8 in Kaliumphosphatpuffer und für die aus *R. graveolens* L. (Thompson *et al.*, 1978) ein Optimum zwischen 7,3-8,0 in Tris-HCl berichtet worden.

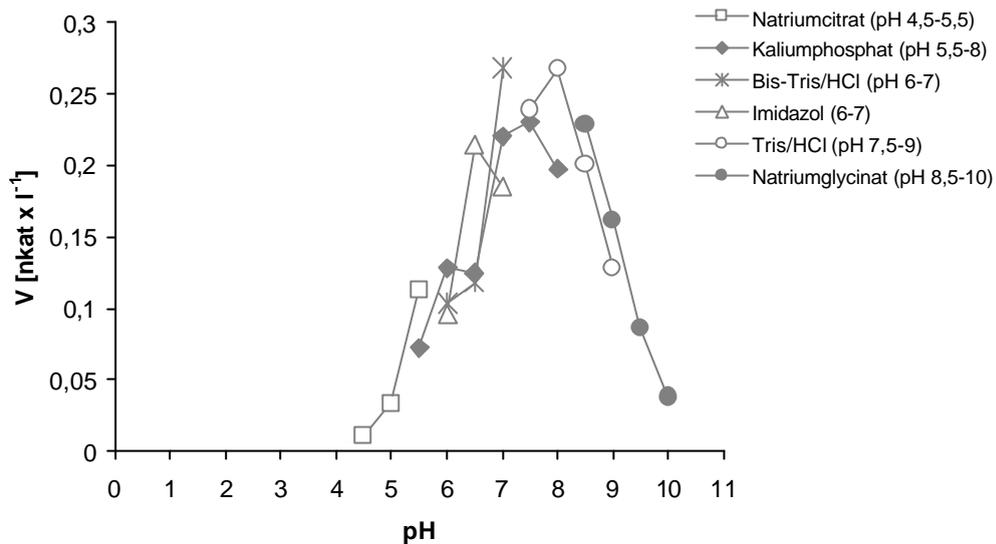


Abbildung 20: pH-Abhängigkeit der BMT-Aktivität

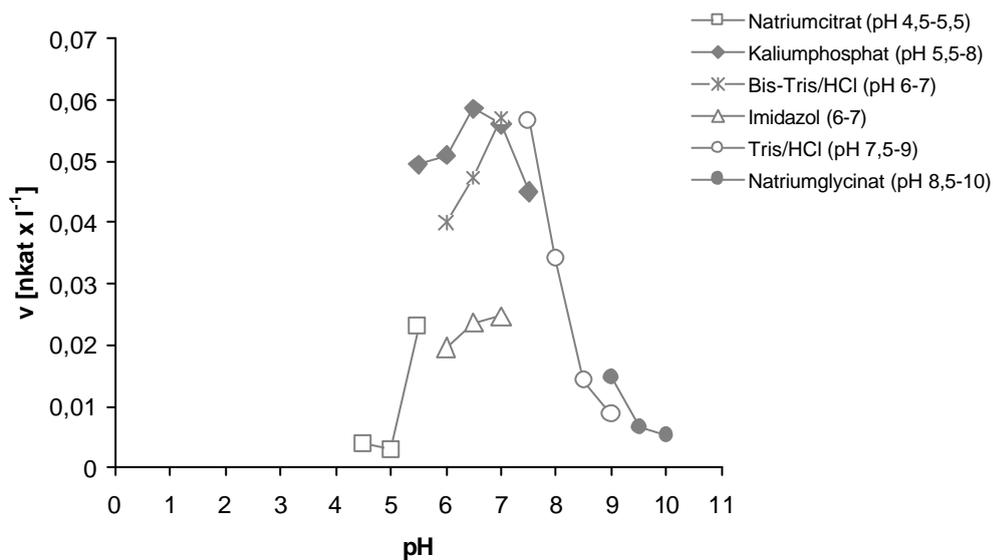


Abbildung 21: pH-Abhängigkeit der XMT-Aktivität

D.1.2.2 Temperaturabhängigkeit

Das Temperaturoptimum der BMT- und XMT-Aktivität wurde mit 17,4 µg Protein pro Inkubationsansatz in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 (BMT) oder pH 7,5 (XMT) bestimmt. Die BMT weist eine hohe Aktivität in einem Temperaturbereich von 35-40°C auf (**Abb. 22**). Weitergehende Messungen bei Temperaturen über 40°C wurden an dieser Stelle nicht vorgenommen, sondern erst bei der Charakterisierung des rekombinanten Enzyms. Im Gegensatz zur BMT zeigt die XMT die höchste Aktivität in einem Bereich zwischen 25 und 30°C.

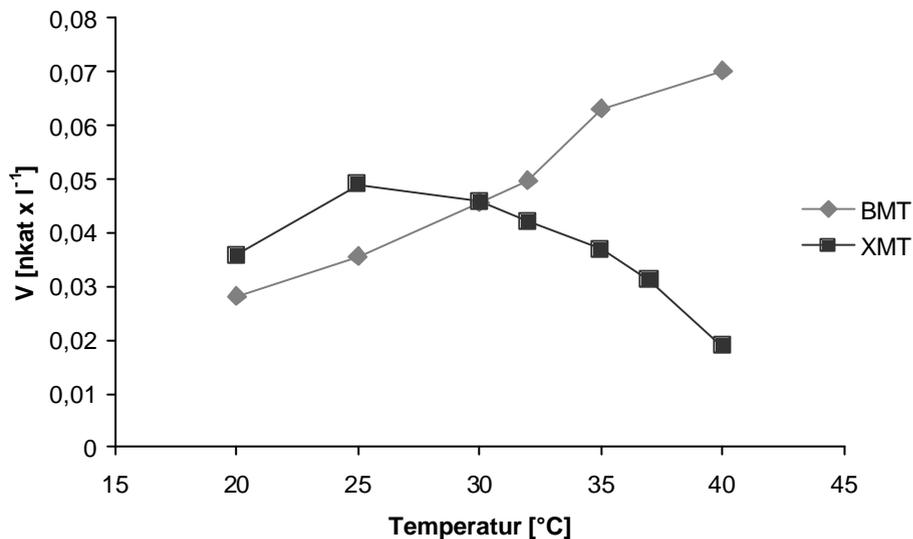


Abbildung 22: Temperaturabhängigkeit der BMT und XMT-Aktivität

D.1.3 Induktion von COMT und CCoAOMT in *Ammi majus* Zellkultur

Die Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferase (CCoAOMT) wurde hinsichtlich ihres Induktionsverhaltens untersucht, da im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zu den cDNAn der BMT und COMT auch die einer CCoAOMT ermittelt werden konnte.

Konstitutiv ist die COMT gut (spezifische Aktivität 2,4 $\mu\text{kat}/\text{kg}$), die CCoAOMT dagegen nur schwach messbar (spezifische Aktivität: 291,5 nkat/kg). Daher wurden Zellkulturen nach 6 Tagen in Suspension für 2, 3, 4, 5, 8 und 11 h durch Zusatz von *Pmg*-Elicitor induziert und die Aktivitäten von COMT und CCoAOMT verfolgt. Für die COMT konnte über den gesamten Zeitraum kein Anstieg der Enzymaktivität festgestellt werden (**Abb. 23**). Die Aktivität der CCoAOMT stieg nach 5 Stunden Induktion im Vergleich zur nicht-induzierten Probe auf das 9,5-fache, nach 8 Stunden auf das 10,2-fache an. Danach nahm die Enzymaktivität kontinuierlich wieder ab. Im Vergleich zu *A. majus* zeigt die CCoAOMT in Zellkulturen von *P. crispum* ein deutlich späteres Aktivitätsmaximum nach 10-15 h (Schmitt *et al.*, 1991; Grimmig *et al.*, 1999). Die Induzierbarkeit der CCoAOMT ist vergleichbar mit den Daten bereits bekannter CCoAOMTn, die in die Pflanzenabwehr involviert sind (Pakusch *et al.*, 1989; Busam *et al.*, 1997; Martz *et al.*, 1998).

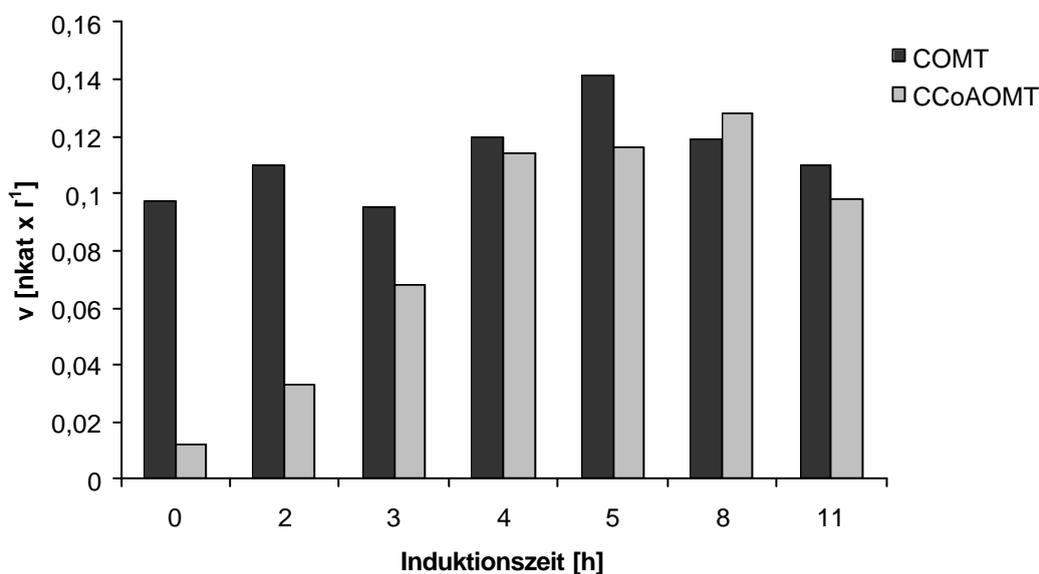


Abbildung 23: Aktivität von COMT und CCoAOMT nach Induktion mit *Pmg*-Elicitor

Die Inkubationen wurden in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 mit ca. 17,4 μg (COMT) bzw. ca. 8,7 μg Protein (CCoAOMT) für 1 h bei 35°C (COMT) bzw. 30°C (CCoAOMT) durchgeführt.

D.1.4 COMT-Aktivität in Suspensionszellkulturen und *Ammi majus*-Gewebe

Parallel zur Bestimmung der BMT- und XMT-Aktivitäten wurde auch die COMT-Aktivität in Extrakten aus *A. majus*-Zellen bestimmt (D.1.3). Darüber hinaus wurden zum Vergleich auch Extrakte nicht-induzierter Zellen aus *P. crispum* und *R. graveolens* gemessen. Die Inkubationen in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 wurden mit 17,4 µg Protein nach Standardbedingungen (C.5.2.3) durchgeführt.

Die *A. majus* L.-Linien „*A. majus*“ und „*A. majus* neu“ („*Amn*“) zeigen nur geringe Enzymaktivität (2,0-2,4 µkat/kg). Das 3,5-4-fache an Aktivität wurde dahingegen in *R. graveolens* L.-Zellkulturen gemessen (Abb. 24). Die Zellkulturen von *P. crispum* L. zeigen nur sehr geringe COMT-Aktivität.

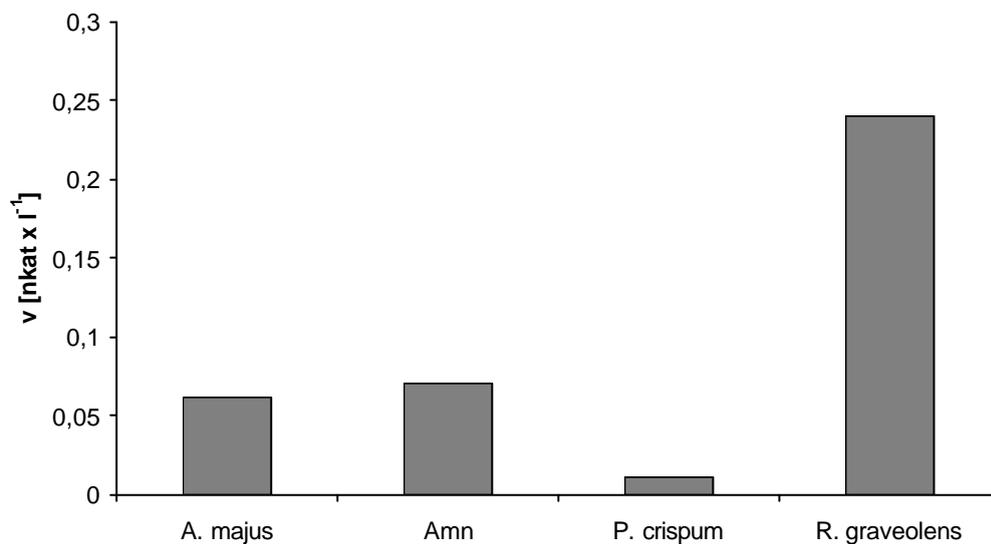


Abbildung 24: COMT-Aktivität aus Suspensionszellkulturen von *A. majus*, *P. crispum* und *R. graveolens*

Mit dieser relativ geringen COMT-Aktivität aus den Zellen kann keine Klonierung des Enzyms vorgenommen werden. Um zu überprüfen, ob eine höhere Aktivität aus Frischpflanzenextrakten gemessen werden kann, wurden Wurzeln, Stengel, Blätter und Blüten aufbereitet (C.3.1) und die Rohextrakte für die Enzymtests eingesetzt.

Sehr hohe COMT-Umsatzraten zeigten die Extrakte aus Stengeln, Blättern und Blüten (**Abb. 25**). Aus dem Rohextrakt des Stengelgewebes konnte mit $4,2 \mu\text{kat}/\text{kg}$ die höchste spezifische Aktivität ermittelt werden. Dieses Gewebe diente auch zur anschließenden Gesamt-RNA-Isolierung. Das Wurzelmaterial zeigte geringere COMT-Aktivität.

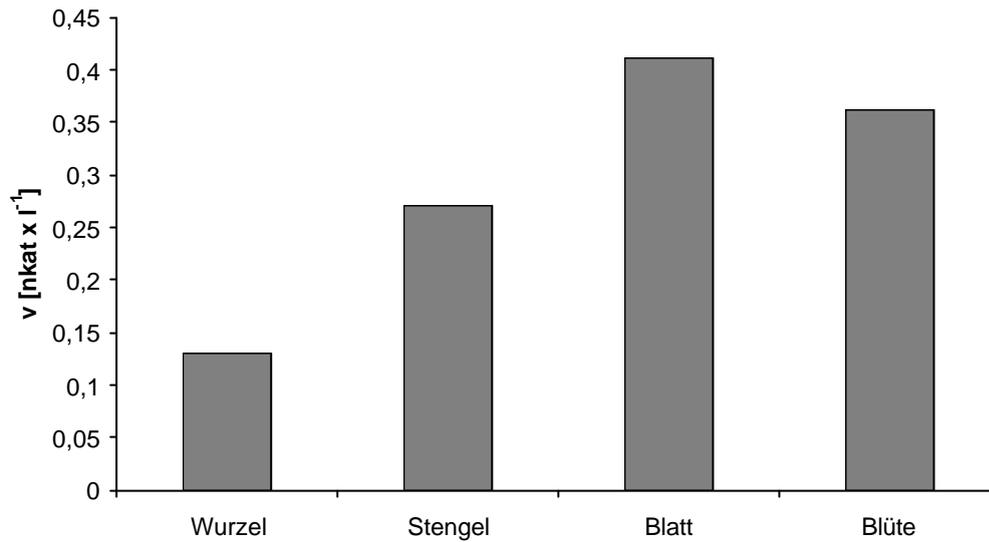


Abbildung 25: COMT-Enzymaktivität verschiedener Pflanzensegmente von *A. majus*

D.2 Klonierung von OMTn

D.2.1 Amplifizierung OMT-spezifischer Fragmente

In der Literatur sind fünf hochkonservierte Regionen im Bereich des C-Terminus von OMTn aus dem Propanstoffwechsel beschrieben (Ibrahim *et al.*, 1998). Diese Regionen lieferten die Vorlage zur Konstruktion degenerierter Primer (Dumas *et al.*, 1992; Frick & Kutchan, 1999), mit denen OMT-spezifische Fragmente isoliert werden können.

Tabelle 2: Oligonukleotide zur Amplifizierung OMT-spezifischer Fragmente nach Frick & Kutchan (1999)

Name	Oligonukleotid
OMT 1 (universe)	5'-GTI GAC/T GTI GGI GGI GGI ACI GGI GC-3'
OMT 5 (reverse)	5'-GGI GCA/G TCC/T TCI ATI ACA/G TGI GG-3'
OMT 6 (reverse)	5'-CAA/G TGI G/TCA/G TCI C/GIC CAA/G TCA/G TG-3'

Mit (/) angegebene Basen sind alternativ im Primer vorhanden, I steht für Inosin.

Basierend auf den Induktionsversuchen zur BMT, XMT und COMT-Aktivität (**D.1.1/D.1.3-4**) wurde die Gesamt-RNA aus den *Pmg*-Elicitor induzierten Zellen (5 h), nicht induzierten Zellen und Pflanzengewebe isoliert (**C.4.4**) und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe von PCR-Techniken wurden Fragmente im Größenbereich von 110 bp durch Verwendung der Primer OMT 1 und 5 sowie im Bereich von 220 bp durch Verwendung der Primer OMT 1 und 6 (**Tab. 2**) amplifiziert. Es konnten drei verschiedene 215 bp DNA-Sequenzen (Sequenz 1-3) ermittelt werden, die nach Translation eine hohe Homologie zu heterologen OMTn und besonders zu COMTn zeigen und intakte 5'- bzw. 3'-PCR Primer aufweisen.

Ein 177 bp großes DNA-Fragment (Sequenz 4) mit einer sehr hohen Homologie zu Caffeoyle-CoA-OMTn wurde ebenfalls durch PCR-Techniken generiert und von Frau Silvia Specker zur Verfügung gestellt.

D.2.2 Gewinnung der vollständigen Sequenzen

Die 3'-Enden der vier Fragmente wurden mit Hilfe des 3'-RACE generiert. Neben dem Adapterprimer (AP) (**Tab. 3**) wurde jeweils eine Teilsequenz aus den amplifizierten Fragmenten als genspezifischer Primer (GSP) (**Tab. 3**) verwendet. Bei Vorliegen gemischter

cDNA-Fragmente aus der PCR wurde eine „nested“ PCR mit dem „Abridged Universal Adapterprimer“ (AUAP) (**Tab. 3**) und einem weiteren GSP durchgeführt. Die Amplifikation der 3'-Enden erfolgte in einem Gradientenzykler bei „annealing“-Temperaturen zwischen 53-64°C.

Für die COMT-ähnlichen Sequenzen (Sequenz 1-3; BMT/COMT/COMT-ähnliches-Protein) wurden Fragmente von 675, 598 und 486 bp und für die CCoAOMT-ähnliche Sequenz (Sequenz 4; CCoAOMT) von 257 bp amplifiziert. Alle Sequenzen wiesen ein poly(A)⁺-Ende auf. Das als „COMT-ähnliches Protein“ bezeichnete Enzym konnte im Rahmen dieser Arbeit keiner Funktion zugeordnet werden, wird aber zur Vereinfachung im folgenden COMT2 genannt.

Tabelle 3: Oligonukleotide zur 3'-RACE

	Name	Oligonukleotid
<i>Sequenz 1 (BMT)</i>	GSPI 5.9.2	5'- GGA AGA TGC TCC ATC TTA TCC TGG -3'
	AP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT T ₍₁₆₎ -3'
	AUAP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'
<i>Sequenz 2 (COMT)</i>	OMT 1	5'-GTI GAC/T GTI GGI GGI GGI ACI GGI GC-3'
	AP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT T ₍₁₆₎ -3'
<i>Sequenz 3 (COMT-ähnliches- Protein (COMT2))</i>	GSPI 18.1.a	5'-GGT CAA GAA TGC ACC TTC ATT ACC TGG-3'
	AP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT T ₍₁₆₎ -3'
	GSPII 18.1.a	5'- CGA ATC AGT TCC GAG AGG AGA TG -3'
	AUAP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'
<i>Sequenz 4 (CCoAOMT)</i>	GSP 13	5'- GGA ATG GTT CTG TGG CTC AGC -3'
	AP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT T ₍₁₆₎ -3'
	GSP 14	5'- GCT CAA CAA AGC TCT GGC TGC -3'
	AUAP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'

Mit (/) angegebene Basen sind alternativ im Primer vorhanden, I steht für Inosin. Zur besseren Übersicht tragen die Sequenzen ihre endgültige Bezeichnung.

Alle vier 3'-RACE-Fragmente zeigten die unter **D.2.1** aufgewiesenen Homologien zu COMTn (BMT/COMT/COMT2) bzw. CCoaOMTn (CCoAOMT).

Zur Isolierung vollständiger cDNA Klone der BMT und CCoAOMT wurde die 5'-RACE-Technik mit dem „C-tailing“ verwendet. Bei dieser Technik werden Cytidin-Reste an das 5'-Ende von DNA-Sequenzen geknüpft, um die Anlagerung eines Guanodin-reichen Oligonukletids wie des „Abridged Adapterprimers“ (AAP) zu ermöglichen. Für die Amplifizierung wurde der AAP und Teilsequenzen aus amplifizierten Fragmenten als GSP

(**Tab. 4**) eingesetzt. Das 5'-RACE wurde auch mit dem „*A-tailing*“ durchgeführt. Mit dieser Methode wurden keine cDNA-Fragmente generiert. Die Amplifizierung der 5'-Enden erfolgte analog den Bedingungen für das 3'-RACE. Im Falle der BMT wurde ein 723 bp und für die CCoAOMT ein 715 bp Amplicon erhalten. Beide Fragmente waren vollständig in 5'-Richtung verlängert, einschließlich des Startkodons und 17 bp (BMT) bzw. 42 bp (CCoAOMT) des untranslatierten Bereichs.

Tabelle 4: Oligonukleotide zur 5'-RACE von BMT und CCoAOMT-Fragmenten

	Name	Oligonukleotid
<i>BMT</i>	AAP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG -3'
	GSPI 6.1a	5'- GCA CTC TTA GTT GTA CTG TCG -3' (RT-PCR-Primer)
	GSPIII 6.1a	5'- CCT TCT TAT TGT CTC CCA AAG C -3'
	GSPIV 6.1a	5'- CCA CAC CAG GAT AAG ATG GAG C -3'
<i>CCoAOMT</i>	AAP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG -3'
	GSP 23	5'- GCA CAG GGT AAC TCC ATC G -3' (RT-PCR-Primer)
	GSP 18	5'- CTC AAT CCT GGG ATC AGC AGC -3'
	GSP 19	5'- GCA GCC AGA GCT TTG TTG AGC -3'

Der Bereich von 53-64°C ist ausreichend für das „*annealing*“. Inosin (I) dient der Herabsetzung der „*annealing*“-Temperatur des AAP.

Die Amplifizierung der 5'-Enden der COMT und COMT2 wurde mittels RLM-RACE-Technik durchgeführt. Vollständige 5'-Enden konnten durch die RACE-Technik nicht generiert werden. Deshalb wurde eine RLM-PCR durchgeführt. In der ersten PCR-Runde wurde eine Teilsequenz aus amplifizierten Fragmenten als GSP und der „5'-Primer GeneRacer“ als Oligonukleotide (**Tab. 5**) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente im Agarosegel lieferte in beiden Fällen keine diskreten Banden sondern nur einen verdichteten „DNA-Schmier“ im Größenbereich von ca. 250-4000 bp. Durch eine „*nested*“ PCR konnten Fragmente von 885 bp für die COMT bzw. von 526 bp für die COMT2 amplifiziert werden. Beide Fragmente waren vollständig in 5'-Richtung verlängert, einschließlich des Startkodons und 23 bp (COMT) bzw. 10 bp (COMT2) des untranslatierten Bereichs.

Tabelle 5: GeneRacer-Oligonukleotide für die RLM-RACE von COMT und COMT2

	Name	Oligonukleotid
<i>COMT</i>	GeneRacer Oligo dT Primer	5'- GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T) ₁₈ -3' (RT-PCR-Primer)
	GeneRacer 5' Primer	5'- CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA -3'
	GSPCOMT24III	5'- CCA TCC TTG GGG AGT GCC TTA TAG C -3'
	GeneRacer 5'Nested Primer	5'- GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'
	GSPCOMT24b	5'- CCT TAT AGC AGT TCT TCA AGA ACG -3'
<i>COMT2</i>	GeneRacer Oligo dT Primer	5'- GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T) ₁₈ -3' (RT-PCR-Primer)
	GeneRacer 5' Primer	5'- CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA -3'
	GSP 27	5'- CCA CCT CTT GCA CTC CCT CCA ATC C -3'
	GeneRacer 5'Nested Primer	5'- GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'
	GSP 26	5'- CCA TTG CTT GGC TCA GAA GTT CAG C -3'

D.3 Sequenzanalysen

D.3.1 BMT

Die BMT-cDNA von 1369 bp kodiert mit ihrem offenen Leserahmen („*open reading frame*“, ORF) von 1062 bp für ein Protein von 354 Aminosäuren (**Abb. 26**). Der ORF ist flankiert von einer 17 bp 5'-untranslatierten Region (UTR) und einer 290 bp 3'-UTR, in der auf 268 bp ein 22 bp poly(A)-Schwanz folgt. Für das translatierte Polypeptid errechnet sich eine kalkulierte Molekularmasse von 38,7 kDa.

```

6.1NcoAnfang  GCCAAAACCTGAATCC
                AAGCCAAAACCTGAATCA      17

ATGGCAG >
ATGCAGAAATGAAGACTAGTCCATCTCAAGACGAAGAAGCTGGCGTGGTAGCCATGCAA      77
M  A  E  M  K  T  S  P  S  Q  D  E  E  A  G  V  V  A  M  Q      20

CTAGCAACTTCTACAGTACTCCCCATGATTCTCAAATCAGCAATAGAGCTTGACTTGTTA      137
L  A  T  S  T  V  L  P  M  I  L  K  S  A  I  E  L  D  L  L      40

AATACCATTGCCAAAGCTGGCCCTGGTAACTATTTATCTCCTTCTGATCTTGCCCTCTAAG      197
N  T  I  A  K  A  G  P  G  N  Y  L  S  P  S  D  L  A  S  K      60

```

CTTCTCTTGTGGAACCCCGATGCACCCGTCATGCTTGCTCGCATCCTCCGAGTCCTGGCT	257
L L L S N P D A P V M L A R I L R V L A	80
ACCTACAAGGTTCTTGGTTGTAAGCGTGGTGAAGTTGAGTGGCTCTACTGCTGGACACCA	317
T Y K V L G C K R G E V E W L Y C W T P	100
GTGTGCAAGTACTTGTGCAATAACGAAGATGGTGCTTCTATAGCTCCGATTTTGTAGTG	377
V C K Y L S N N E D G A S I A P I L L V	120
CACCAGGACAAAGTTACAATCAAGAGTTGGTATCATTTAACAGATGCAGTTCGTGATGGA	437
H Q D K V T I K S W Y H L T D A V R D G	140
GGAAGTGCATTTAACAAAGGCCCATGATATGAGTATTTTTGAGTATGCGAGCCAAGATCCT	497
G T A F N K A H D M S I F E Y A S Q D P	160
CAATTTAACAAAGCGTTTAATCGCTCAATGAGAGGTCCTCTACTATAACCATGAAAAAA	557
Q F N K A F N R S M R G H S T I T M K K	
OMT1 GTIGAYGTIGGIGGIGGI	
ATACTTGAAACTTACAAAGGTTTCGAAGGTCCTCAAACTTATGTTGATGTTGGCGGTGGC	617
I L E T Y K G F E G L K S I V D V G G G	200
ACIGGIGC >	
ACTGGTGCTACCCCTTAACATGATCATCTCCAAGTACCCTACTATCAAAGGCATTAACCTC	677
T G A T L N M I I S K Y P T I K G I N F	220
< CGAGGTAGAATAGGACCACACC GSPIV6.1a	
GSPI5.9.2 GGAGATGCTCCATCTTATCCTGG >	
GACCTCCCTCACGTTGTGCGGAGATGCTCCATCTCTTCTGGTGTGGAACATGTAGGGGA	737
D L P H V V G D A P S L P G V E H V G G	240
< GTRCTR	
AACATGTTTGTAGTGTGCCAAAAAGGAGACGCCATATTCTTGAAGTGGATATTCATAGT	797
N M F A S V P K G D A I F L K W I F H S	260
ACCISICTRCKIGTRAC OMT6	
TGGGGTGATGAAGAGTGCCTGAAGATCTTGAAAAAGTGTCCACCAAGCTTTGGGAGACAAT	857
W G D E E C L K I L K K C H Q A L G D N	280
< CGTCTTAAGTAGGAAGGACTTC GSPII6.1a < GCTGTCATGT	
AAGAAGGTCATTGTTGCAGAATTCATCCTTCTGAAAGATCCCGAGGTAGCGACAGTGCA	917
K K V I V A E F I L P E D P G G S D S A	300
TGATTCTCACG GSPI6.1a	
ACTAAGAGTGCGGTTCATCTTGATGCTATAATGTTGGCATATGTTCCAGGTGGAAAAGAG	977
T K S A V H L D A I M L A Y V P G G K E	320
AGGACAGAAAAAGAGTTTGAATCTTTAGCTAAAAGGGCAGGATTTAAGAGTTTCACCAAG	1037
R T E K E F E S L A K R A G F K S F T K	340
GTGTGCTGTGCTTTTAATACTTGGATTATGGAATTTTCCAAGTAGAGTGCTCTGTGTTTCG	1097
V C C A F N T W I M E F S K *	354
AAAGTGTTTTGTATCATCAGTAACTTCTCTTTTGTGATTCTAGCTAGAAATATGCAATAAG	1157
GGCCACAATTCCAAGCTTGTATCCTTCAGAATGTCTGTCACACTTTTGAAAAATTCATAT	1217
CAATCGTGTAATCAAATTTATTACAAAGTCCAAATTATGTTTTCTTTGGACTCTTTGCT	1277
< CCTTCCTTCTAACAAGGTCCTAGGAAAC GSP 16BamHI	
TTCTGAAAATAGGAAGGAAGATTGTTCCATGTTTCGGTTTTAAATAAATTGAGCTATTCAGC	1337
AGATCTTGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1369

Abbildung 26: Nukleinsäuresequenz und translatiertes Polypeptid der BMT

Die Nukleotide und die im Einbuchstabencode unter der Nukleotidsequenz zugeordneten Aminosäuren sind auf der rechten Seite nummeriert. Das Startkodon ist fettgedruckt und unterstrichen, das Stopkodon zusätzlich mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Alle wesentlichen Primer sind im Fettdruck abgebildet.

Die Aminosäuresequenz der BMT wurde mit Sequenzen aus Datenbanken unter Verwendung des WU-Blast2 (Embl, Heidelberg) (C.4.8) verglichen und eine große Homologie zu COMTn festgestellt. Mit Hilfe des Programms „ClustalW“ (Ebi) (C.4.8) wurde die BMT-Sequenz mit COMT-Sequenzen aus *Coffea canephora* (Campa *et al.*, 2001; AF454632), *Catharanthus roseus* (Schröder *et al.*, 2002; AY028439), *Capsicum annuum* (Lee *et al.*, 1998; U83789), *Ocimum basilicum* (Wang *et al.*, 1999; AF154917) und *Prunus dulcis* (Garcia-Mas *et al.*, 1995; Genbank X83217) verglichen und eine Konsensussequenz erstellt (Abb. 27). Diese Sequenz zeigt 69,7 % Ähnlichkeit basierend auf 184 identischen Aminosäureresten (50,3 % der Gesamtsequenz) und 19,4 % konservativen Austauschen. Die BMT-Sequenz wurde zudem paarweise mit den COMT-Sequenzen verglichen (Tab. 6). Ein Vergleich mit zusätzlichen COMT-Sequenzen aus *Capsicum chinense* (Curry *et al.*, 1998; AF081214) und *Rosa chinensis* (Cock *et al.*, 2002; AJ439740) erbrachte sogar 72,3 % Ähnlichkeit (Hermann *et al.*, 2004). In diesem Vergleich wurde die COMT aus *C. canephora* nicht berücksichtigt.

Tabelle 6: Identität des BMT-Polypeptids mit heterologen COMTn

	<i>C. canephora</i>	<i>C. roseus</i>	<i>C. annuum</i>	<i>O. basilicum</i>	<i>P. dulcis</i>
BMT <i>A. majus</i>	66,3 %	63,5 %	64,7 %	64,1 %	63,7 %

Die Unterschiede in den Polypeptidsequenzen von BMT und COMTn konzentrieren sich nicht auf einen Bereich, sondern sind über das gesamte Molekül verstreut. Insbesondere im Bereich des N-Terminus und der Region 91-99, mit einer Lücke von fünf Aminosäureresten, sind andere Aminosäuresequenzen zu erkennen.

	1	11	21	A	31	41	51
BMT-Amm	MAEMK-----	TSPSQDEEAG	VVAMQLATST	VLPMLKSAI	ELDLLNTIAK	AGPGNYLSPS	
COMT-Cof	-----	---MAEEEAC	LFAMSLASAS	VLPMVLKSAI	ELDLLELIAK	AGPGAYVSPS	
COMT-Cat	MGSANPDNKN	SMTKEEEEAC	LSAMRLASAS	VLPMVLKSAI	ELDLLELIKK	SGPGAYVSPS	
COM1-Oci	MGSAT--NTP	QINSDEEENF	LFAMQLASAS	VLPMVLKSAI	ELDLLELIKK	SGAGAFVSPV	
COMT-Cap	MDSTN---Q	NLTQTDEEAF	LFAMQLASAS	VLPMVLKSAI	ELDLLEIMAK	AGPGAAISPS	
COMT-Pru	MGSTGETQMT	PTQVSDEEAN	LFAMQLASAS	VLPMVLKAAI	ELDLLEIMAK	AGPGVFLSPT	
		..*	. ** * ..	****. ** *	***** . *	. * * . **	
Konsensus	MGS N N	TS EEEA	LFAMQLASAS	VLPMVLKSAI	ELDLLELIAK	AGPGAYVSPS	
	61	71	81	91	101	111	
BMT-Amm	DLASKLLLSN	PDAPVMLARI	LRVLATYKVL	GCK-R---G	EVEWLYCWTP	VCKYLSNNE	
COMT-Cof	ELAAQLPHTN	PEAPIMLDRI	LRLLATYSVL	DCKLNNLADG	GVERLYGLAP	VCKFLTKNAD	
COMT-Cat	ELAAQLPTQN	PDAPVMLDRI	LRLLASYSVL	NCTLKDLDPG	GIERLYSLAP	VCKFLTKNED	
COM1-Oci	DLAAQLPPTN	PDAPVMLDRI	LRLLTYSAIL	ECRLKTLDPG	GVERLYGLAP	VCKFLTKNED	
COMT-Cap	ELAAQLPTKN	PEAPVMLDRM	LRLLATYSVL	NCLRTRLDPG	RVERLYSLAP	VCKFLTKNAD	
COMT-Pru	DIASQLPTKN	PDAPVMLDRM	LRLLASYSIL	TYSLRTRLADG	KVERLYGLGP	VCKFLTKNEE	
	..*.* *	*.* ** *	**.*.* *	*	* ** *	*** *.* *	
Konsensus	LAAQLPTKN	PDAPVMLDRI	LRLLA YSVL	NC LRTLDPG	GVERLYGLAP	VCKFLTKNED	

D. Ergebnisse

	121	131	141	151	161	171
BMT -Amm	GASIAPILLV	HQDKVTIKSW	YHLTDAVRDG	GTAFNKAHDM	SIFEYASQDP	QFNKAFNRS ^M
COMT-Cof	GVSMAPLLLM	NQDKVLMESW	YHLKDAVLGD	GIPFNKAYGM	TAFEYHGTDP	RFNKVFNQGM
COMT-Cat	GVSMALLLM	NQDKVLMESW	YHLKDAVLE ^G	GIPFNKAYGM	TAFEYHGKDP	RFNKVFNQGM
COM1-Oci	GVSMAPLTL ^M	NQDKVLMESW	YHLSDAVVDG	GIPFNKAYGM	TAFEYHGTDP	RFNKVFNQGM
COMT-Cap	GVSVAPLLLM	NQDKVLMESW	YHLTDAVLGD	GVPFNKAYGM	TAFEYHGTDP	RFNKVFNRGM
COMT-Pru	GVSIAPLCLM	NQDKVLESW	YHLKDAVLE ^G	GIPFNKAYGM	TAFEYHGTDP	RFNKVFNRGM
	* * * . * .	. * * * . * * *	* * * * * . *	* * * * * . *	. * * * . * *	. * * * * * *
Konsensus	GVSMAPLLLM	NQDKVLMESW	YHLKDAVLGD	GIPFNKAYGM	TAFEYHGTDP	RFNKVFN GM
	181	191	201	I 211	221	II 231
BMT -Amm	RGHSTITM ^{KK}	ILETYKGFEG	LKSI ^V VDVGGG	TGATLNMIIS	KYPTIKGINF	DLPHV ^V VDAP
COMT-Cof	SNHSTITM ^{KK}	ILEVYRGFEG	LKTI ^V VDVGGG	TGATLNMIIS	KYPTIKGINF	ELPHV ^V VEDAP
COMT-Cat	SNHSTIIM ^{KK}	ILEIYQGFQ ^G	LKTI ^V VDVGGG	TGATLNMI ^{VS}	KYPSIKGINF	DLPHV ^I IEDAP
COM1-Oci	SNHSTITM ^{KK}	ILETYTGFDG	LKTI ^V VDVGGG	TGATLNMI ^{VS}	KYPSIKGINF	DLPHV ^I IEDAP
COMT-Cap	SDHSTMTM ^{KK}	ILEDYKGFEG	LNSI ^V VDVGGG	TGATVNMIVS	KYPSIKGINF	DLSHV ^I IEDAP
COMT-Pru	ADHSTITM ^{KK}	ILETYKGFEG	LTSI ^V VDVGGG	TGAVLNMI ^{VS}	KYPSIKGINF	DLPHV ^I IEDAP
	* * * . * * *	* * * * * * *	* . * * * * * *	* * * . * * * *	* * * . * * * * *	. * * * . * * *
Konsensus	SNHSTITM^{KK}	ILETYKGFEG	LK VVDVGGG	TGATLNMI^{VS}	KYPSIKGINF	DLPHV^IIEDAP
	241	III 251	261	271	281	IV 291
BMT -Amm	SLPGVEHVGG	NMFASVPKGD	AIFLWIFHS	WGDEECLKIL	KKCHQALGDN	KKVIVAEFIL
COMT-Cof	SHSGVEHVGG	DMFVSVPKGD	AIFM ^W ICH ^D	WSDDHCRKLL	KNCYQALPDN	GKVI ^L LAECVL
COMT-Cat	SYPGVEHVGG	DMFVSVPKGD	AIFM ^W ICH ^D	WSDAHCLKFL	KNCHEALPEN	GKVILAE ^C LL
COM1-Oci	SYPGVEHVGG	DMFVSVPKGD	AIFM ^W ICH ^D	WSEHCVKFL	KNCYDALPON	GKVI ^L LAECVL
COMT-Cap	AYPGVEHVGR	DMFVSVPKAD	AIFM ^W ICH ^D	WSEHCLKFL	KNCYEALPAN	GKVI ^V AE ^C IL
COMT-Pru	QYPGVEHVGG	DMFVSVPKGD	AIFM ^W ICH ^D	WSEHCLKFL	KNCYAALPDN	GKVI ^L LAECIL
	* * * * *	. * * * * * *	* * * * * *	* * * * * *	* . * * * * *	* * . * * *
Konsensus	SYPGVEHVGG	DMFVSVPKGD	AIFM^WICH^D	WSEHCLKFL	KNCY ALPDN	GKVI^LLAECIL
	301	311	B 321	V 331	341	351
BMT -Amm	PEDPGGSDSA	TKSAVHLD ^{AI}	MLAYVPGGKE	RTEKEFESLA	KRAGFKSFTK	VCCAFNTWIM
COMT-Cof	PEAPD-TSLA	TQNVVHVDV ^V	MLAHNPGGKE	RTEKEFEALA	KGAGFKEFRK	VCSAVNTWIM
COMT-Cat	PEAPD-STLS	TQNTVHVDV ^I	MLAHNPGGKE	RTEKEFEALA	KGAGFRGFIK	VCCAYNSWIM
COM1-Oci	PEAPD-TGLA	TKNVVHIDV ^I	MLAHNPGGKE	RTEKEFQGLA	KAAGFKQFNK	ACCAYNTWIM
COMT-Cap	PETPD-TSAA	TKNAVHVDV ^I	MLAHNPGGKE	RTEKEFEALA	KGAGFTGFRR	ACCAYQTWIM
COMT-Pru	PVAPD-SSLA	TKGVVHIDV ^I	MLAHNPGGKE	RTEQEFQALA	KGAGFQGFNV	ACSAFNTYVI
	* * * . . .	* . * * * . .	* * * . * * * *	* * * . * * * *	* * * * *	* * * * *
Konsensus	PEAPDG SLA	TKNVVHVDV^I	MLAHNPGGKE	RTEKEFEALA	KGAGFKGF K	CCA^VNTWIM
	361					
BMT -Amm	EFSK--					
COMT-Cof	ELCK--					
COMT-Cat	ELLK--					
COM1-Oci	ELLK--					
COMT-Cap	EFHK--					
COMT-Pru	EFLKKN					
	* . *					
Konsensus	E LKKN					

Abbildung 27: Vergleich der Polypeptidsequenz von *A. majus* BMT mit heterologen COMTn

Die Konsensussequenz wurde abgeleitet von der BMT aus *A. majus* und COMTn aus *Coffea canephora* (COMT-Cof; Genbank AF454632), *Catharanthus roseus* (COMT-Cat; Genbank AY028439), *Capsicum annuum* (COMT-Cap; Genbank U83789), *Ocimum basilicum* (COMT-Oci; Genbank AF154917) und *Prunus dulcis* (COMT-Pru; Genbank X83217). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) und konservierte Austauschungen mit einem Punkt (.) gekennzeichnet. Eingefügte Lücken (-) dienen der direkten Vergleichbarkeit. Blau unterlegt sind konservierte Aminosäuren und Regionen, die an der SAM-Bindung beteiligt sind, gelb markierte Aminosäuren besitzen katalytische Funktion (Zubieta *et al.*, 2002). Die eingerahmten Regionen IV stellen hochkonservierte Motive dar, die in allen pflanzlichen OMTn (Ausnahme Caffeoyl-CoA-OMT) enthalten sind (Ibrahim *et al.*, 1998). Die unterbrochen eingerahmten Motive A und B sollen Bedeutung für die Substratspezifität besitzen (Zubieta *et al.*, 2001).

D.3.2 COMT

Die COMT-cDNA von 1240 bp kodiert mit ihrem größten offenen Leserahmen (ORF) von 1095 bp für ein Protein von 365 Aminosäuren (**Abb. 28**). Für das translatierte Polypeptid errechnet sich eine Molekularmasse von 40,15 kDa. Der ORF ist flankiert von einer 23 bp 5'-UTR und einer 122 bp 3'-UTR. Diese schließt den 17 bp poly(A)-Schwanz mit ein.

	COMT24univers CAATTCTCCCACC	
	AGAAAGCAAACAATTCTCCAAT	23
ATGGATACCACTACG >		
ATGA AATACCACTACGGAGCTCATCCCACCAACATTCCAAGTAAATGACGATGAAGAAGAA		83
M N T T T E L I P P T F Q V N D D E E E		20
GCTTGCATGTTTCGCCATGCAATTAGCAAGTGCTTCTGTGTTGCCTATGGTTCTCAAATCA		143
A C M F A M Q L A S A S V L P M V L K S		40
GCCATTGAGCTTAACTTCTCGAGTCCATAGCTAAAGCTGGCCCCGGTGCTTATGTTTCG		203
A I E L N L L E S I A K A G P G A Y V S		60
CCTTCTCAGCTTGC GGCTGCCCTTCTTCGAGCCAACCTGACACGCCTGTCATGCTTGAC		263
P S Q L A A A L P S S Q P D T P V M L D		80
CGCATCCTCAGACTCCTAGCTAGCTACTCTGTGCTCAACTGTAAACTTCGTGATTTACCT		323
R I L R L L A S Y S V L N C K L R D L P		100
GACGCTCGGGTTGAGCGCCTCTATGGATTGGCTCCTGTCTGCAAGTTCTTGACTAAAAAC		383
D A R V E R L Y G L A P V C K F L T K N		120
TCTGATGGTGTGTCTATGGCTCCGCTTTTGCTCATGAATCAAGACAAAATCCTTATGGAG		443
S D G V S M A P L L L M N Q D K I L M E		140
AGCTGGTATCACTTGAAGGATGCTGTTCTTGATGGCGGAATTCCTTTTAAACAAGGCATAT		503
S W Y H L K D A V L D G G I P F N K A Y		160
< GTCGTAAACTCATAGTGCCGTTTCTGGG COMT24Mutagenese		
GGAATGACAGCATTTGAGTACCATGGCAAAGACCCCAGATTTAACAAAAGTCTTTAACAG		563
G M T A F E Y H G K D P R F N K V F N Q		180
GGGATGTCTAATCATTCTACTATAACTATGAAGAAAATCCTCCAAACATACGATGGTTTTT		623
G M S N H S T I T M K K I L Q T Y D G F		200
OMT1 GTIGAYGTIGGIGGIGGIACIGGIGC >		
GGCGGTCTTAAAACCTGTGGTGGATGTTGGCGGAGGCACTGGAGCCACACTTAATATGATT		683
G G L K T V V D V G G G T G A T L N M I		220
ATCTCTAAATATCCCAATCTCAAAGGGATTAACCTTTGATCTCCCTCACGTCGTTGAAGAT		743
I S K Y P N L K G I N F D L P H V V E D		240
GCTCCCTCTTATGCTGGTGTGGAGCATGTTGGAGGTGACATGTTTGTAGCGTGCCAAAA		803
A P S Y A G V E H V G G D M F V S V P K		260
	< GC	
< GTRCTRACCISICTRCKIGTRAC OMT6		
GGGGATGCTATTTTTTATGAAGTGGATATGTCACGATTGGAGCGATGCACATTGCTGGCG		863
G D A I F M K W I C H D W S D A H C L A		280

AAGAACTTCTTGACGATATTCC GSPCOMT24b	
< CGATATTCCGTGAGGGGTTCTACC GSPCOMT24III	
TTCTTGAAGAACTGCTATAAGGCACTCCCCAAGGATGGAAAAGGTGATACTAGCGGAATGC	923
F L K N C Y K A L P K D G K V I L A E C	300
ATTCTTCCAGAGGCTCCGGACTCCAAACTTACAACCAAGAATGTCATTCTTATAGATGTG	983
I L P E A P D S K L T T K N V I L I D V	320
ATTATGCTTGCACATAATCCTGGCGGAAAAAGAAAGAACTGAGAAAGAATTTGAGGCCTTT	1043
I M L A H N P G G K E R T E K E F E A F	340
GGAAAAACAGGCTGGTTTCAAAAAGCTTTAAACAAGGCCTGCTGTGCTTATAAATACTTGGGTT	1103
G K Q A G F K S F N K A C C A Y N T W V	360
< CTACTATTTAGGAACCCCTCGAAACCTAGGAAAC COMT24revers	
ATTGAATATTATAAAATAGATGATAAATCCTTGGGAGCTTTGGTAAATTGTGTGACGTTTGA	1163
I E Y Y K *	365
ATTTCTTGCCACAATTAAGGGATATATGTGAAAATAAAAAATTTCAATGGAATTTAGGAAGT	1223
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1240

Abbildung 28: Nukleinsäuresequenz und translatiertes Polypeptid der COMT

Die Nukleotide und die im Einbuchstabencode unter der Nukleotidsequenz zugeordneten Aminosäuren sind auf der rechten Seite nummeriert. Das Startkodon ist fettgedruckt und unterstrichen, das Stopkodon zusätzlich mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Alle wesentlichen Primer sind im Fettdruck abgebildet.

Das COMT-Polypeptid wurde ebenfalls mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen und eine sehr große Homologie zu heterologen COMTn festgestellt. Auf Grundlage einiger dieser Sequenzen (**Tab. 7**) lässt sich eine Konsensussequenz ermitteln, die zur *A. majus* COMT 64,5 % Ähnlichkeit aufweist (**Abb. 29**). Diese basiert auf 165 identischen Aminosäuren (44,5 % der Gesamtsequenz) und 20,0 % konservativen Austauschen. Der Vergleich mit den Sequenzen von COMTn aus *Catharanthus roseus*, *Coffea canephora*, *Ocimum basilicum* und *Populus tremuloides* zeigte sogar einen Ähnlichkeitsgrad von 78,5 % mit einer Identität von 61,9 % (227 AA) und konservativen Austauschen von 16,6 % (61 AA). Zusätzlich wurden die Sequenzen auch paarweise mit der *A. majus* COMT verglichen (**Tab. 7**).

Tabelle 7: Identität der Polypeptide von *A. majus* COMT und von heterologen COMTn

Organismus	Identität mit <i>A. majus</i> COMT	Referenz
<i>Capsicum annuum</i>	74,8 %	Lee <i>et al.</i> , 1998; Genbank U83789
<i>Capsicum chinense</i>	71,5 %	Curry <i>et al.</i> , 1998; Genbank AF081214
<i>Catharantus roseus</i>	79,5 %	Schröder <i>et al.</i> , 2002 ; AY028439
<i>Clarkia breweri</i>	73,5 %	Wang <i>et al.</i> , 1997; Genbank AF006009
<i>Coffea canephora</i>	75,5 %	Campa <i>et al.</i> , 2001; Genbank AF454632
<i>Eucalyptus gunnii</i>	74,2 %	Poeydomenge <i>et al.</i> , 1994 ; Genbank X74814
<i>Medicago sativa</i>	71,7 %	Gowri <i>et al.</i> , 1991; Genbank M63853
<i>Ocimum basilicum</i>	80,0 %	Wang <i>et al.</i> , 1999; Genbank AF154918
<i>Populus tremuloides</i>	75,5 %	Tsai <i>et al.</i> , 1995 ; Genbank X62096
<i>Prunus dulcis</i>	75,5 %	Garcia-Mas <i>et al.</i> , 1995; Genbank X83217
<i>Rosa chinensis</i>	74,1 %	Cock <i>et al.</i> , 2002; Genbank AJ439740
<i>Zinnia elegans</i>	71,9 %	Ye <i>et al.</i> , 1995 ; Genbank U19911

D. Ergebnisse

	1	11	21	A 31	41	51
COMT-Amm	MNTTTELIPP	TFQVNDDEEE	ACMFAMQLAS	ASVLPMLKLS	AIELNLLESI	AK---AGPGA
			*****.***	*****	* * *
Konsensus	MGSTG ETQ	MTPTQVSDEE	ANLFAMQLAS	ASVLPMLKLS	AIELDLLEIM	AKSIPAGPGA
	61	71	81	91	101	111
COMT-Amm	YVSPSQLAAA	LPSSQ-PDTP	VMLDRILRLL	ASYSVLNCKL	RDLDPARVER	LYGLAPVCKF
	. *	** . * . .	. * * * * *	. *	* * * *	. * * * *
Konsensus	FVSPSELAAQ	LPTKNNPDAP	VMLDRILRLL	ASYSVLTCL	RTLDPGKVER	LYGLAPVCKF
	121	131	141	151	161	171
COMT-Amm	LTKNSDGVSM	APLLLMNQDK	ILMESWYHLK	DAVLDDGGIPF	NKAYGMTAFE	YHGKDPFRFNK
	* * * * *	. . * * * * *	. * * * * *	* . . . * * *	* * * * * *	* * * * *
Konsensus	LTKNEDGVSI	APLLLMNQDK	ILMESWYHLK	DAVLDDGGIPF	NKAYGMTAFE	YHGKDPFRFNK
	181	191	201	I 211	221	231 II
COMT-Amm	VFNQGMNSHS	TITMKKILQT	YDGFGLKTV	V DVGGGTGAT	LNMIISKYPN	LKGINFDLPH
	. * * * * *	* . * * * *	* * * * *	*****	. * * *	. * * * * *
Konsensus	VFN GMSDHS	TITMKKILET	YKGFGLKTV	V DVGGGTGA	LNMIISKYPS	IKGINFDLPH
	241	251 III	261	271	281	291 IV
COMT-Amm	VVEDAPSYAG	VEHVGGDMV	SVPKGDALFM	WICHD SDA	HCLAFLNKCY	KALPKDGKVI
	* . * * *	. * * * *	* . * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Konsensus	VIEDAPSYPG	VEHVGGDMV	SVPKGDALFM	WICHD SDE	HCLKFLNKCY	EALP NGKVI
	301	311	321 B	331 V	341	351
COMT-Amm	LAECILPEAP	DSKLTTKNVI	LIDVIMLAHN	FGKERTKEKE	FEAFGKQAGF	KSFNKACCAY
	. * * * * *	* . * * * * * *	*****	* . . *	. * * *
Konsensus	LAECILPEAP	DTSLATKNV	HIDVIMLAHN	FGKERTKEKE	FEALAKGAGF	GF ACCAF
	361					
COMT-Amm	NTWVIEYYK--					
	. . . * *					
Konsensus	NTWMEFLKKA					

Abbildung 29: Vergleich des COMT-Polypeptids mit der COMT-Konsensussequenz

Die COMT-Konsensussequenz wurde abgeleitet von COMTn aus *Capsicum annum* (Genbank U83789), *Capsicum chinense* (AF081214), *Catharanthus roseus* (AY028439), *Clarkia breweri* (AF006009), *Coffea canephora* (AF454632), *Eucalyptus gunnii* (X74814), *Medicago sativa* (M63853), *Ocimum basilicum* (AF154917), *Populus tremuloides* (X62096), *Prunus dulcis* (X83217), *Rosa chinensis* (AJ439740) und *Zinnia elegans* (U19911). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) und konservierte Austauschungen mit einem Punkt (.) gekennzeichnet. Eingefügte Lücken (–) dienen der direkten Vergleichbarkeit. Blau unterlegt sind konservierte Aminosäuren und Regionen, die an der SAM-Bindung beteiligt sind, gelb markierte Aminosäuren besitzen katalytische Funktion (Zubieta *et al.*, 2002). Die eingerahmten Regionen I-V stellen hochkonservierte Motive dar, die in allen OMTn (Ausnahme Caffeoyl-CoA-OMT) enthalten sind (Ibrahim *et al.*, 1998). Die unterbrochen eingerahmten Motive A und B sollen Bedeutung für die Substratspezifität besitzen (Zubieta *et al.*, 2001).

Die Unterschiede in den Polypeptiden von *A. majus* COMT und heterologen COMTn sind über das gesamte Molekül verstreut. Nur im Bereich des N- und C-terminalen Endes sowie in den Regionen 51-80 und 90-110 sind wesentliche Unterschiede in den Sequenzen zu erkennen.

D.3.2.1 Sequenzvergleich von BMT und COMT aus *A. majus*

Die Vergleiche des BMT-Polypeptids mit heterologen COMTn hatten bereits die hohe Homologie (**Abb. 27**) mit einer Identität von 50,3 % und einer Ähnlichkeit von 69,7 % gezeigt. Der homologe Vergleich von BMT und COMT aus *A. majus* bestätigte dieses Ergebnis mit einer Identität von 64 % bei einer Ähnlichkeit von 78,4 % (**Abb. 30**). Auch hier sind die Unterschiede in den Sequenzen über das gesamte Molekül verstreut. Die von Zubietta *et al.* (2001) vorgeschlagenen Regionen mit Einfluss auf die OMT-Substratspezifität zeigen nur geringe Unterschiede (vier nichtkonservierte Austausche). Es ist unklar, inwiefern diese Unterschiede die Substratspezifität beeinflussen. Die für die SAM-Bindung verantwortlichen Bereiche liegen hochkonserviert vor.

	1	11	21	A	31	41	51
BMT -Amm	---MAEMKTS	PSQ----DEE	AGVVAMQLAT	STVLPMLLKS	AIELDLLNTI	AKAGPGNYLS	
COMT -Amm	MNTTTELIPP	TFQVNDDEE	ACMFAMQLAS	ASVLPMLLKS	AIELNLLESI	AKAGPGAYVS	
	. * .	* . **	* . *****	. *****	. *****	***** . * . *	***** * . *
	61	71	81	91	101	111	
BMT -Amm	PSDLASKLLL	SNPDAPVMLA	RILRVLATYK	VLGCKR----	-GEVEWLYCW	TPVCKYLSNN	
COMT -Amm	PSQLAAALPS	SQPDPVMLD	RILRLLASYS	VLNCKLRDLP	DARVERLYGL	APVCKFLTKN	
	** . * . *	* . * . * . * . *	***** . * . *	** **	** **	. * . * . * . *	
	121	131	141	151	161	171	
BMT -Amm	EDGASIAPIL	LVHQDKVTIK	SWYHLTDAVR	DGGTAFNKAH	DMSIFEYASQ	DPQFNKAFNR	
COMT -Amm	SDGVSMAPLL	LMNQDKILME	SWYHLKDAVL	DGGIPFNKAY	GMTAFEYHGK	DPRFNKVFNQ	
	** * . * . *	* . * . * . *	***** **	** * . * . *	* . * . *	** . * . * . *	
	181	191	201	211	221	231	
BMT -Amm	SMRGHSTITM	KKILETYKGF	EGLKSIVDVG	GGTGATLNMI	ISKYPTIKGI	NFDLPHVVDG	
COMT -Amm	GMSNHSTITM	KKILQTYDGF	GGLKTVVDVG	GGTGATLNMI	ISKYPNLKGI	NFDLPHVVED	
	* *****	***** . * . *	** * . * . *	***** **	***** . * . *	***** * . *	
	241	251	261	271	281	291	
BMT -Amm	APSLPGVEHV	GGNMFASVPK	GDAIFLKWIF	HSWGDEECLK	ILKKCHQALG	DNKKVIVAEF	
COMT -Amm	APSYAGVEHV	GGDMFVSVPK	GDAIFMKWIC	HDWSDAHCLA	FLKNCYKALP	KDGKVLAEK	
	** * . * . *	** * . * . *	***** . * . *	* * * . *	. * . * . * . *	. . * . * . *	
	301	311	321	B	331	341	351
BMT -Amm	ILPEDPGGSD	SATKSAVHLD	AIMLAYVPGG	KERTEKEFES	LAKRAGFKSF	TKVCCAFNTW	
COMT -Amm	ILPEAPD-SK	LTTKNVLLID	VIMLAHNPGG	KERTEKEFEA	FGKQAGFKSF	NKACCAYNTW	
	**** * *	. ** * . * . * . *	***** **	***** .	. * . * . * . *	* * . * . * . *	
	361						
BMT -Amm	IMEFSK						
COMT -Amm	VIEYYK						
	. * . *						

Abbildung 30: Vergleich der Polypeptide von BMT und COMT aus *A. majus*

Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) und konservierte Austausche mit einem Punkt (.) gekennzeichnet. Eingefügte Lücken (-) dienen der direkten Vergleichbarkeit.

D.3.3 CCoAOMT

Die CCoAOMT-cDNA von 963 bp kodiert mit ihrem größten offenen Leserahmen (ORF) von 723 bp für ein Protein von 241 Aminosäuren (**Abb. 31**), dessen kalkulierte Molekularmasse 27,1 kDa beträgt. Die Sequenz umfasst weiterhin eine 71 bp große 5'-UTR und eine 3'-UTR von 169 bp einschließlich des 20 bp poly(A)-Schwanzes.

	CAGGAGCTCCG	11
	CaffCoANcoAnfang CACCATATTTCCC	
TCAACTACAAACAACATAAAAGAAGCATAACAAAAGCTTAAAACTAACACCATATTTCAA		71
ATGGCTTCTAATGG >		
ATGGCTTCTAATGGTGAATCCAAGCATTCTGAAGTTGGGCACAAGAGTCTATTGCAAAGT		131
M A S N G E S K H S E V G H K S L L Q S		20
GATGCTCTTTATCAGTATATACTTGAAAACAAGTGTGTACCCAAGAGAGCCAGAGGCAATG		191
D A L Y Q Y I L E T S V Y P R E P E A M		40
< GGTTTCGTAGGCACCTTAGACTACTG CaffCoA-Intern1		
AAAGAGCTTAGAGAGGTGACCGCCAAGCATCCATGGAATCTGATGACAACATCAGCTGAT		251
K E L R E V T A K H P W N L M T T S A D		60
< CGGTTCTTGCTACCTTTAA		
GAAGGGCAATTCTTGAACATGCTCTTGAAGCTTATTAATGCCAAGAACACCATGGAAATT		311
E G Q F L N M L L K L I N A K N T M E I		80
CCAC CaffCoANco-Intern2		
GGTGTTTACACTGGTTATTCTCTCCTTGCCACTGCCCTGGCTCTTCCAGATGATGGAAAG		371
G V Y T G Y S L L A T A L A L P D D G K		100
ATTTTGGCAATGGACATCAACAGAGAAAACATGAAATTGGATTACCCATTATTGAAAAA		431
I L A M D I N R E N Y E I G L P I I E K		120
GCTGGAGTTGGTCACAAAATTGACTTCAGAGAAGGCCAGCTTTCCTGTTCTTGATCAG		491
A G V G H K I D F R E G P A L P V L D Q		140
ACGCTTGAAGATGGAAAGTATCATGGAACATTTGATTTTGTATTTGTTGATGCTGACAAG		551
T L E D G K Y H G T F D F V F V D A D K		160
GATAACTACATCAACTACCACAAGAGATTAATTGATTTAGTAAAAGTTGGAGGACTTATC		611
D N Y I N Y H K R L I D L V K V G G L I		180
GSP13 GGAATGGTTCTGTGGCTCAGC >		
GGCTACGACAACACCTTATGGAATGGTTCTGTGGCTCAGCCAGCTGATGCTCCGATGAGA		671
G Y D N T L W N G S V A Q P A D A P M R		200
< CGAGTTGTTTCGAGACCGACG GSP19		
< CGACGACTA		
GSP14 GCTCAACAAAGCTCTGGCTGC >		
AAGTATGTAAGGTACTACAGAGACTTTGTGATTGAGCTCAACAAAGCTCTGGCTGCTGAT		731
K Y V R Y Y R D F V I E L N K A L A A D		220
GGGTCTAACTC GSP18	< GCTACCTCAATGGGACACG GSP23	
CCCAGGATTGAGATCTGTATGCTTCTGTGGCGATGGAGTTACCCTGTGCCGTCTGATC		791
P R I E I C M L P V G D G V T L C R R I		240
AG TGA ATTATCTAACTGAAAATTTGAGATATTATTTTCACTGTTTTAAAAAATTGGGAT		851
S *		241

< **CGTTACACGTAATAACT**

ACTTTTGCCTTTGATTTTATCTTCCTATGTTTCTTGTGAAATTTGCAATGTGCATTATTGA 911

ACCTAGGAAAC GSP25BamHI

TGATGAATATATTTCATAATTGATGTTGATATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 963

Abbildung 31: Nukleinsäuresequenz und translatiertes Polypeptid der CCoAOMT aus *A. majus*

Die Nukleotide und die im Einbuchstabencode unter der Nukleotidsequenz zugeordneten Aminosäuren sind auf der rechten Seite nummeriert. Das Startkodon ist fettgedruckt und unterstrichen, das Stopkodon zusätzlich mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Alle wesentlichen Primer sind im Fettdruck abgebildet.

Der Vergleich des CCoAOMT-Polypeptids mit Sequenzen aus Datenbanken zeigte eine sehr große Homologie zu heterologen CCoAOMTn. Auf der Grundlage einiger dieser Sequenzen (**Tab. 8**) wurde eine Konsensussequenz erstellt, die eine Ähnlichkeit von 70,8 % zur *A. majus* CCoAOMT aufweist (**Abb. 32**). Die Ähnlichkeit basiert auf 140 identischen Aminosäuren (52,4 % der Gesamtsequenz) und 18,4 % konservativen Austauschen. Die *A. majus* CCoAOMT wurde außerdem paarweise mit den heterologen CCoAOMTn auf Identität verglichen (**Tab. 8**).

Tabelle 8: Identität der Polypeptide von der *A. majus* CCoAOMT und heterologen CCoAOMTn.

Organismus	Identität mit <i>A. majus</i> CCoAOMT	Referenz
<i>Citrus natsudaikai</i>	83,8 %	Gryciuk <i>et al.</i> , 1999; Genbank AB035144
<i>Eucalyptus globulus</i>	87,5 %	De Melis <i>et al.</i> , 1999; Genbank AF168780
<i>Eucalyptus gunnii</i>	84,4 %	Rech <i>et al.</i> , 1997; Genbank Y12228
<i>Medicago sativa</i>	83 %	Inoue <i>et al.</i> , 1998; Genbank AX259371
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	82,3 %	Michalowski <i>et al.</i> , 1998; Genbank AF053553
<i>Nicotiana tabacum</i>	91,3 % / 85,8 %	Busam <i>et al.</i> , 1997; Genbank Z82982, Z56282
<i>Nicotiana tabacum</i>	88,8 %	Martz <i>et al.</i> , 1998; Genbank U62734
<i>Petroselinum crispum</i>	98,8 %	Schmitt <i>et al.</i> , 1991; Genbank Z54183
<i>Pinus taeda</i>	79,2 %	Li <i>et al.</i> , 1999; Genbank AF036095
<i>Populus tremuloides</i>	87,5 %	Meyermans <i>et al.</i> , 2000; Genbank U27116
<i>Vitis vinifera</i>	88 %	Busam <i>et al.</i> , 1997; Genbank Z54233
<i>Zea mays</i>	77,9 %	Civardi <i>et al.</i> , 1999; Genbank AJ242980
<i>Zinnia elegans</i>	84,9 %	Ye <i>et al.</i> , 1994; Genbank U13151

CCoAOMTn zeigen aufgrund ihrer kurzen Sequenz nur eine geringe Ähnlichkeit zu homologen und heterologen OMTn. Die Daten bekannter Sequenzmotive (Ibrahim *et al.* 1998) und Röntgenstrukturdaten (Zubieta *et al.*, 2001, 2002) von OMTn lassen keine Aussagen zu funktionellen Bereichen der CCoAOMT-Sequenzen zu. Die Catechol-OMT der Ratte (Vidgren *et al.*, 1994) wurde aufgrund ihrer ähnlichen Molekülmasse und der Mg^{2+} -Abhängigkeit bereits mit CCoAOMTn verglichen. Catechol OMTn gehören zu den COMTn. Da die durch Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Daten über Bindemotive nur begrenzt auf CCoAOMTn übertragbar sind, gibt es bislang keine sicheren Erkenntnisse zu CCoAOMTn. Die Kristallisierung einer CCoAOMT (Daten noch unveröffentlicht) wird nähere Einblicke in die Lage von SAM-Bindungsmotiven und an weiteren Funktionen beteiligten Aminosäuren ermöglichen.

CCoAOMT-Amm	1 MASN----- **	11 -----	21 -----GES	31 KHSEVGHKSL ****	41 LQSDALYQYI * * * * *	51 LETSVYPREP * . * * * *	
Konsensus	MATN V AA	V	TGEEQ	QTNGNGEQ G	RHQEVGHKSL	LQSDALYQYI	LETSVYPREP
CCoAOMT-Amm	61 EAMKELREVT . **** . *	71 AKHPWNLMTT * . * * * * *	81 SADEGQFLNM * * * * * * *	91 LLKLINAKNT . * . * * *	101 MEIGVYTGYS . * * * * *	111 LLATALALPD * . * . * . *	
Konsensus	EPMKELREVT	AKHPWNLMTT	SADEGQFLNM	LLKLINAKNT	MEIGVYTGYS	LLATALALPD	
CCoAOMT-Amm	121 DGKILAMDIN * * * * * *	131 RENYEIGLPI . * . . * * *	141 IEKAGVGHKI * . * * * . *	151 DFREGPALPV . * * * * * *	161 LDQTLLEDGKY * * . .	171 HGTFDFVFVD . * . * * * *	
Konsensus	DGKILAMDIN	RENYEIGLPV	IEKAGVAHKI	DFREGPALPV	LDQ IEDGKN	HGSFDFIFVD	
CCoAOMT-Amm	181 ADKDNYYNYH * * * * * *	191 KRLIDLKVKV . * . * * * *	201 GLIGYDNTLW * . * * * * *	211 NGSVAQPADA * * * * *	221 PMRKYVRYR * . * * * . *	231 DFVIELNKAL * * * . * * *	
Konsensus	ADKDNYYNYH	KRLIDLKVKV	GLIGYDNTLW	NGSVVAPPDA	PMRKYVRYR	DFVLELNKAL	
CCoAOMT-Amm	241 AADPRIEICM * * * * *	251 LPVGDGVTLC . * * * * *	261 RRIS--- * * .				
Konsensus	AADPRIEICM	LPVGDGITLC	RRISLSI				

Abbildung 32: Vergleich des *A. majus* CCoAOMT mit der CCoAOMT-Konsensussequenz

Die CCoAOMT-Polypeptide aus *Citrus natsudaidai* (AB035144), *Eucalyptus globulus* (AF168780), *Eucalyptus gunnii* (Y12228), *Medicago sativa* (AX259371), *Mesembryanthemum crystallinum* (AF053553), *Nicotiana tabacum* (U62734, Z82982, Z56282), *Petroselinum crispum* (Z54183), *Pinus taeda* (AF036095), *Populus tremuloides* (U27116), *Vitis vinifera* (Z54233), *Zea mays* (AJ242980) und *Zinnia elegans* (U13151) wurden verglichen und eine CCoAOMT-Konsensussequenz erstellt. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) und konservierte Austauschungen mit einem Punkt (.) gekennzeichnet. Eingefügte Lücken (-) dienen der direkten Vergleichbarkeit.

Beachtenswert ist der außerordentlich hohe Grad der Identität von 98,8 % der CCoAOMT aus *A. majus* und der aus *P. crispum* (Schmitt *et al.*, 1991) bei 99,6 % Ähnlichkeit (**Abb. 33**). Die enge Verwandtschaft hatte sich auch bereits am Beispiel der Zimtsäure 4-Hydroxylasen (C4H) beider Pflanzenspezies mit einer Homologie von 98,6 % bei 99,6 % Ähnlichkeit gezeigt (Hübner *et al.*, 2003).

CCoAOMT-Amm	MASNGESKHSEVGHKSLQLSDALYQYILETSVYPREPEAMKELREVTAKHPWNLMTTSAD	60
CCoAOMT-Pet	-----	
CCoAOMT-Amm	EGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVYTGYSLLATALALPDDGKILAMDINRENYEIGLPIIEK	120
CCoAOMT-Pet	-----	
CCoAOMT-Amm	AGVGHKIDFREGPALPVLQDTLEDGKYHGTFDFVFDADKDNYINYHKRLIDLKVGGLI	180
CCoAOMT-Pet	-----HM-----I-----	
CCoAOMT-Amm	GYDNTLWNGSVAQPADAPMRKYVRYRDFVIELNKALAADPRIEICMLPVG DGVTLCRRRI	240
CCoAOMT-Pet	-----	
CCoAOMT-Amm	S 241	
CCoAOMT-Pet	-	

Abbildung 33: Vergleich der CCoAOMT-Polypeptide aus *A. majus* und *P. crispum*

Nur abweichende Aminosäuren sind in der Sequenz aus *P. crispum* aufgeführt, nicht-konservierte Austausche sind im Fettdruck hervorgehoben.

D.3.4 COMT2 (COMT-ähnliches-Protein)

Die COMT2-cDNA von 1179 bp kodiert mit ihrem größten offenen Leserahmen (ORF) von 1074 bp für ein Protein von 358 Aminosäuren (**Abb. 34**), für das sich eine Molekularmasse von 39,6 kDa errechnet. Die Sequenz umfasst eine 10 bp große 5'-UTR und eine 3'-UTR von 95 bp einschließlich des poly(A)-Schwanzes von 17 bp.

	GSP30 CCAAACC	
	ATACCAAACC	10
ATGGCTTCCCATGATCAAGAAGC >		
ATGGCTTCCCATGATCAAGAAGCGTTCTTAGCAGCTATGCAAATAGTGAATTCTTCAACT		70
M A S H D Q E A F L A A M Q I V N S S T		20
GTAGATGGGGTGCTAAATGCTCTAATTGAGCTGAATGTCTTTGACATTATCATGAAAAAA		130
V D G V L N A L I E L N V F D I I M K K		40
GTTGGCCTTGATGGCTACCTTCACCCCTGATGAAATTCATTTGAATCTTCCTGCAAAAAAC		190
V G L D G Y L H P D E I A L N L P A K N		60
CTCGAAGCCTCGGATATGCTTGATCGTATGCTTCGCCTTCTCGCAACCCACTCCATCATC		250
L E A S D M L D R M L R L L A T H S I I		80

AAATGCAAGCTTGTAAAAAGAAGTGGCGGGACTCATCGTCTCACTAGATCATATGGCTTG	310
K C K L V K R S G G T H R L T R S Y G L	100
ACATCTATCTCTCAATACTTTGTTTCAGGCTAAAAGATGGACCTTGCCTTGCTCCTTATATC	370
T S I S Q Y F V Q A K D G P C L A P Y I	120
AGGCTCATTTCATCACAAAAGAGATGCAGAGGAGTTGGTCTAAAGTGAAGGATGCAACTATC	430
R L I H H K E M Q R S W S K V K D A T I	140
GAGGGAGGGGTTCCGTTCAACAAGGCTCACGGGGGAAAAGAATATATTTGAATATTTAGAA	490
E G G V P F N K A H G G K N I F E Y L E	160
< CGACTTGAAGACTCGGTTTCGTTACC GSP26	
AAGGATAAAGACCTGGCTGAACTTCTGAGCCAAGCAATGGACAAGTCGATTGCTACTTCC	550
K D K D L A E L L S Q A M D K S I A T S	180
< CCTAACCTCCCTCACGTTCTCCACC GSP27	
OMT1 GTIGAYGTI	
ATGAATATACTTCTACAGATGTACAAAGGATTGGAGGGAGTGCAAGAGGTGGTGGATGTA	610
M N I L L Q M Y K G L E G V Q E V V D V	200
GGIGGIGGIACIGGIGC >	
GGTGGTGCTCATGGAGCAACTTTGAGTTGTATTGTTTCTATGAACCCTCATCTTAAGGGA	670
G G A H G A T L S C I V S M N P H L K G	220
GSPII18.1.a GGTCAAGAATGCACCTTCATTACCTGG >	
ATTAACCTTTGATCTACCTCATGTGGTCAAGAACGCACCTTCATTACCTGGTATAGTGCAT	730
I N F D L P H V V K N A P S L P G I V H	240
GSPII18.1.a CGAATCAGTTCCGAGAGGAGATG >	
GTGGGAGGAGATATGTTTCGAATCAGTTCCGAGAGGAGATGTTATATTGCTTCAGAGATTA	790
V G G D M F E S V P R G D V I L L Q R L	260
< GTRCTRACCISICTRCKIGTRAC OMT6	
CTTCATGACTGGACGGACGAAGAAAAGCGTAAAAGATTCTAAAAACGTGTCATGAAGCTTTA	850
L H D W T D E E S V K I L K T C H E A L	280
CCAGATCACGGCAAGGTGGTGATTATAGAGATGATGCCTGCAGAGCTTCCGGAAAATGAT	910
P D H G K V V I I E M M P A E L P E N D	300
< CGTACAACTATATATGTGTGCCCCCT	
GTCCAAGCTAAGAACATTTCTCAGGTGGATATACGCATGTTGATATATACCCATGGGGGA	970
V Q A K N I S Q V D I R M L I Y T H G G	320
TCTCTCTCC 9.4NcoIntern	
AGAGAGAGGACTGCTGAAGAATTTCAAATGCTGGGGAAAAGAAGCTGGATTTGCCAGCTCC	1030
R E R T A E E F Q M L G K E A G F A S S	340
AAATTTATATGTGGAGCAGATTTGTATGGTGTGGTTGAGTTGTACAAGAAAATG <u>TGA</u> ATT	1090
K F I C G A D L Y G V V E L Y K K M *	358
< CAACGGAAAAGGATAC	
TCTTGTGCCTTTTTGCTTGTGACGAAATAATTCTGTGGGACATTGTTGCCTTTTCCTATG	1150
GGGATGCCTAGGAAAC GSP31BamHI	
CCCTACACATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1179

Abbildung 34: Nukleinsäuresequenz und translatiertes Polypeptid der COMT2

Die Nukleotide und die im Einbuchstabencode unter der Nukleotidsequenz zugeordneten Aminosäuren sind auf der rechten Seite nummeriert. Das Startkodon ist fettgedruckt und unterstrichen, das Stopkodon zusätzlich mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Alle wesentlichen Primer sind im Fettdruck abgebildet.

Die Aminosäuresequenz der COMT2 wurde mit verwandten Sequenzen in Datenbanken verglichen um eine Zuordnung zu erreichen. Auf der Basis von COMT-Polypeptiden aus *Catharanthus roseus* (Schröder *et al.*, 2002; Genbank AY028439), *Coffea canephora* (Campa *et al.*, 2001; Genbank AF454632) und *Ocimum basilicum* (Wang *et al.*, 1999; Genbank AF154917) sowie zwei Catechol *O*-Methyltransferasen aus *Thalictrum tuberosum* (Frick & Kutchan, 1999; Genbank AF064693 und AF064694) und der Quercetin 3-*O*-Methyltransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 1997; Genbank AY087297) wurde eine Konsensussequenz erstellt, mit der das COMT2-Polypeptid eine Ähnlichkeit von 56,7 % aufweist (**Abb. 35**). Diese Ähnlichkeit umfasst 117 identische Aminosäuren (31,6 % der Gesamtsequenz) und 25,1 % konservative Austausche.

	1	11	21	A 31	41	51
OMT-Amm	-----	--MASHDQEA	F LA AMQIVNS	STVDGVLNAL	IELNVFDIIM	KKVGLDGYLH
COMT-Cat	MG-SANPDNK	NSMTKEEEEE	CL S AMRLASA	SVLPMVLKSA	IELDLLELIK	KSG-PGAYVS
COMT-Cof	-----	---MAEEEE	CLFAMSLASA	SVLPMVLKSA	IELDLLELIA	KAG-PGAYVS
COM2-Oci	---MSSTANN	PQINSDEEEN	FLFAMQLASA	SVLPMVLKSA	IELDLLELIK	KAG-AGAFVS
OMT1-Ara	MG-STAEQTL	TPVQVTDDEA	FLFAMQLASA	SVLPMALKSA	LELDLLEIMA	KN---GSPMS
OMT2-Tha-1	MGSTENNHNL	TPAEEEEEEA	YLHAMQLASA	SVLPMVLKAA	IELDVLEIIA	KAG-KGAYVA
OMT2-Tha-2	MGSTQKNHNL	TP--EEEEEA	CLHAMQLASA	SVLPMVLKAA	IELSVLEIIA	KAG-QGAYVA
		..*	I* ** . .	* . **	*
Konsensus	MGS NNHNL	TPM EEEEE	CLFAMQLASA	SVLPMVLKSA	IELDLLEIIA	KAGGPAYVS
	61	71	81	91	101	111
OMT-Amm	PDEIALNLPA	KNLEASDMLD	RMLRLLATHS	I IKCKLVKRS	GGTHRLTRSY	GLTSISQYFV
COMT-Cat	PSELAAQLPT	QNPDAPVMLD	RILRLLASYS	VLNCTLKDLP	DG--GIERLY	SLAPVCKFLT
COMT-Cof	PSELAAQLPT	HNPEAPIMLD	RILRLLATYS	VLDCKLNNLA	DG--GVERLY	GLAPVCKFLT
COM2-Oci	PAELAAQLLT	TNAEAHVMLD	RILRLLTSYA	ILECRLKTLF	DG--GVQRLY	GLAPVCKFLT
OMT1-Ara	PTEIASKLPT	KNPEAPVMLD	RILRLLTSYS	VLTCNRRKLS	GD--GVERIY	GLGPVCKYLT
OMT2-Tha-1	PSEIASQLST	SNSQAPTVDL	RMLRLLASYK	VLTCNLRNLE	DG--GVERLY	GLAPVCKFLV
OMT2-Tha-2	PTEIASQLST	SNSQAPIILD	RILRLLASYK	VLTCNLRMLE	DG--GVERLY	GLAPVCKFLV
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Konsensus	PSEIA QLPT	NPEAPVMLD	RILRLLASYS	VLTC LR L	DGTHGVERLY	GLAPVCKFLT
	121	131	141	151	161	171
OMT-Amm	QAKDGPCLAP	YIRLIHHKEM	QRSWSVKVDA	TIEGGVPPFNK	AHGGKNIFEY	LEKDKDLAEL
COMT-Cat	KNEDGVSMAP	LLLNMNQDKVL	MESWYHLKDA	VLEGGIPFNK	AYG-MTAFEY	HGKDPDFNKV
COMT-Cof	KNADGVSMAP	LLLNMNQDKVL	MESWYHLKDA	VLDGGIPFNK	AYG-MTAFEY	HGTDPDFNKV
COM2-Oci	KNEDGVSMAP	LALNMNQDKVL	MESWYHLKDA	VLDGGIPFNK	AYG-MTAFEY	HGTDPDFNKV
OMT1-Ara	KNEDGVSIAP	LCLNMNQDKVL	MESWYHLKDA	ILDGGIPFNK	AYG-MSAFEY	HGTDPDFNKV
OMT2-Tha-1	KNEDGVSMAP	LVLNMNQDKVL	MESWYHLKDA	VLDGGIPFNK	AYG-MTAFEY	HGTDPDFNKV
OMT2-Tha-2	KNEDGVSIAP	LVLNMNQDKVL	MESWYHLKDA	VLDGGIPFNK	AYG-MTAFEY	HGTDPDFNKV
	. ** *	. . . *	** * * . . . *	* * * * *	*
Konsensus	KNEDGVSMAP	L LMNQDKVL	MESWYHLKDA	VLDGGIPFNK	AYGGMATAFEY	HGTDPDFNKV
	181	191	201	I 211	221	231 II
OMT-Amm	LSQAMDKSIA	TSMNILLQMY	KGLEGVQEVV	DVGGAGGATL	SCIVSMNPHL	KGINF DLPHV
COMT-Cat	FNQGMNSHST	IIMKKILEIY	QGFQGLKTIVV	DVGGGTGATL	NMIVSKYPSI	KGINF DLPHV
COMT-Cof	FNQGMNSHST	ITMKKILEVY	RGFEGRLKTVV	DVGGGTGATL	NMIISKYPTI	KGINF ELPHV
COM2-Oci	FNQGMNSHST	ITMKKILETY	TGFDGLKTVV	DVGGGTGATL	NMIISKYPSI	KGINF DLPHV
OMT1-Ara	FNNGMNSHST	ITMKKILETY	KGFEGLTSLV	DVGGGIGATL	KMIVSKYPNL	KGINF DLPHV
OMT2-Tha-1	FNRGMADHST	ITMKKILELY	KGFEGLKSVV	DVGGGTGATV	NMIVTKHPTI	KGINF DLPHV
OMT2-Tha-2	FNRGMADHST	ITMKKILELY	KGFEGLKSVV	DVGGGTGATI	NMIVTKHPTI	KGINF DLPHV
	. * .	* . * * *	* . * . *	**** * . *	* . * . *	**** * . *
Konsensus	FNQGMNSHST	ITMKKILE Y	KGFEGLK VV	DVGGGTGATL	NMIVSKYPTI	KGINF DLPHV

	241	251 III	261	271	281	291 IV
OMT-Amm	VKNAPSLPGI	VHVGGDMFES	VPRGDVILLC	RLLDWTDDE	SVKILKTCH	ALPDHGKVVII
COMT-Cat	IEDAPSYPGV	DHVGGDMFVS	VPKGDAIFMK	WICHDSDAH	CLKFLKNCHE	ALPENGKVVIL
COMT-Cof	VEDAPSHSGV	EHVGGDMFVS	VPKGDAIFMK	WICHDSDDH	CRKLLKNCYQ	ALPDNGKVVIL
COM2-Oci	VEDAPSYPGV	EHVGGDMFVS	VPKGDAIFMK	WICHDSDAH	CVKFLKNCYE	ALPENGKVVIL
OMT1-Ara	IEDAPSHPGI	EHVGGDMFVS	VPKGDAIFMK	WICHDSDEH	CVKFLKNCYE	SLPEDGKVVIL
OMT2-Tha-1	IDDAPAYPGV	EHIGGDMFVS	VPKGDAIFMK	WILHDSDEH	SVKFLKNCYE	SIPADGKVVII
OMT2-Tha-2	IDDAPAYPGV	EHIGGDMFVS	VPKGDAIFMK	WILHDSDEH	SVKFLKNCYE	SIPADGKVVII
	. * . * . *	* * * * * *	** * * * * * * . *	* * * * * * * * . .
Konsensus	IEDAPSYPGV	EHVGGDMFVS	VPKGDAIFMK	WICHDSDEH	CVKFLKNCYE	ALPE GKVVIL
	301	311	321 B	331 V	341	351
OMT-Amm	IEMPAELPE	NDVQAKNISQ	VDIRMLIYTH	GGRETAEEF	QMLGKEAGFA	SSKFICGADL
COMT-Cat	AECCLPEAPD	STLSTQNTVH	VDVIMLAHNP	GGKERTKEKEF	EALAKGAGFR	GFIKVCAYN
COMT-Cof	AECVLPEAPD	TSLATQNVVH	VDVIMLAHNP	GGKERTKEKEF	EALAKGAGFK	EFRKVCASVN
COM2-Oci	AECVLPEAPD	TGLATKNVVH	IDVIMLAHNP	GGKERTKEKEF	QVLAKASGFK	QFNKVCAYN
OMT1-Ara	AECILPETPD	SSLSTKQVVH	VDCIMLAHNP	GGKERTKEKEF	EALAKASGFK	GIKVVCDAFG
OMT2-Tha-1	VESVLPVFPE	TNLAHAHTCFQ	LDNIMLAHNP	GGKERTKDF	KALSVKAGFT	GFKVVCAGFG
OMT2-Tha-2	VESVLPVFPE	TNLAHAHTCFQ	LDNIMLAHNP	GGKERTKDF	EALSAKAGFT	GFKVVCAGFG
	* . * . *	* * * * .	* * * * . * *	. * * * * *	* * * * . *
Konsensus	AECVLPEAPD	T LATKNVVH	VDVIMLAHNP	GGKERTKEKEF	EALAK AGFK	GFKKVCAGF
	361					
OMT-Amm	YGVVELYKKM					
COMT-Cat	SWIMELLK --					
COMT-Cof	TWIMELCK --					
COM2-Oci	SWIMELLK --					
OMT1-Ara	VNLIPELLKKL					
OMT2-Tha-1	SWVMEFCK --					
OMT2-Tha-2	SWVMEFCK --					
	. . * . *					
Konsensus	SW MEL KK					

Abbildung 35: Vergleich der Polypeptide von *A. majus* COMT2 und heterologen OMTn

Die COMT2 (OMT-Amm) wurde verglichen mit COMT-Polypeptiden aus *Catharanthus roseus* (COMT-Cat; Genbank AY028439), *Coffea canephora* (COMT-Cof; AF454632) und *Ocimum basilicum* (COMT-Oci; AF154917) sowie zwei Catechol-*O*-Methyltransferasen aus *Thalictrum tuberosum* (OMT2-Tha-1; AF064693 / OMT2-Tha-2; AF064694) und der Quercetin 3-*O*-Methyltransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* (OMT1-Ara; AY087297). Die abgeleitete Konsensussequenz (Konsensus) ist in der Fußzeile wiedergegeben. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) und konservierte Austauschungen mit einem Punkt (.) gekennzeichnet. Eingefügte Lücken (-) dienen der direkten Vergleichbarkeit. Blau unterlegt sind konservierte Aminosäuren und Regionen, die an der SAM-Bindung beteiligt sind, gelb markierte Aminosäuren besitzen katalytische Funktion (Zubieta *et al.*, 2002). Die eingerahmten Regionen IV stellen hochkonservierte Motive dar, die in allen *O*-Methyltransferasen (Ausnahme Caffeoyl-CoA-OMT) enthalten sind (Ibrahim *et al.*, 1998). Die unterbrochen eingerahmten Motive A und B sollen Bedeutung für die Substratspezifität besitzen (Zubieta *et al.*, 2001).

D.4 Northern-Analyse

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit und des zeitlichen Verlaufes der Induktion der isolierten OMTn wurden Northern Analysen durchgeführt. Dazu wurde die Gesamt-RNA nach Induktion mit *Pmg*-Elicitor über einen Zeitraum von 0-8 h aus *A. majus* Zellen isoliert (Giuliano *et al.*, 1993). Mit den nicht-induzierten Zellkulturen wurde analog nur mit Wasser anstatt Elicitor verfahren. Die 25S rRNA ist das Maß für die Gesamt-RNA-Menge. Daher wurde sie zur semiquantitativen Kontrolle im Agarosegel mit dem Bioimager (Fuji Photo Film; Tokyo, Japan) quantifiziert (**Abb. 36**).

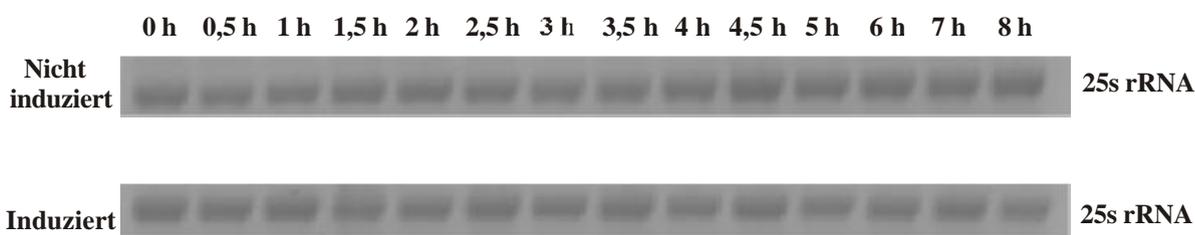


Abbildung 36: Beladung von Agarosegel mit Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA (4 µg pro Spur) aus *A. majus*-Zellen wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Bioimager quantifiziert.

Pro Zeitpunkt wurden 4 µg der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences, Braunschweig) transferiert und mit ³²P-markierten Sonden (ORF der jeweiligen OMT) hybridisiert. Die BMT-Sonde hybridisierte nicht mit den Transkripten der anderen OMTn. Nach einer Verzögerung von ca. 2,5 h stieg die Transkriptmenge stetig an und zeigte ein Maximum bei 7 h (**Abb. 37 u. 38**), danach fiel sie wieder ab. In *P. crispum* zeigt die BMT-mRNA Translationsaktivität nach 2,5 h bei einem Maximum nach erst 17,5 h (Hauffe, 1988). Dieser große Unterschied spiegelt sich auch in den Aktivitätsmaxima wider, da die BMT-Aktivität in *A. majus* ihr Maximum bereits nach 8-11 h, in *P. crispum* dagegen erst nach 35 h erreicht (**D.1.1**). Das Maximum der BMT-Transkriptmenge bei 7 h korreliert mit dem Induktionszeitverlauf der Furanocumarin-Akkumulation und mit sonstigen hier beteiligten Enzymen. Die Zimtsäure 4-Hydroxylase (Hübner *et al.*, 2003), die einen sehr frühen Schritt katalysiert und die Dimethylallyldiphosphat:Umbelliferon 6-C-Dimethylallyltransferase (Hamerski *et al.*, 1990b) zeigen Maxima in elicitierten *A. majus* Kulturen nach 3,5 h bzw. 5-6 h.

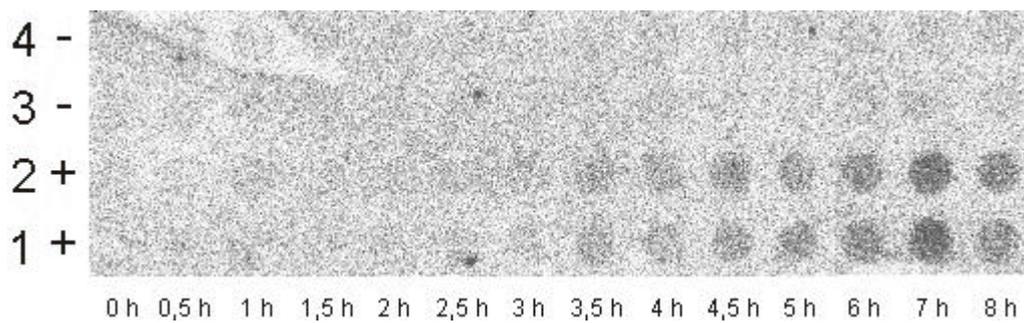


Abbildung 37: Northern-Hybridisierung der BMT-Transkriptmenge aus elicitierten *A. majus* Zellen

Gesamt-RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elicitierung (0-8 h) aus *A. majus* Zellen und aus nicht-induzierten Kontrollzellen isoliert, und jeweils 4 µg wurden für die Northern-Hybridisierung mit einer BMT-spezifischen ³²P-markierten Sonde (Rediprime™ II-random prime labeling system; Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) eingesetzt. Spuren 1+, 2+: RNA aus elicitierten Zellen; Spuren 3, 4: RNA aus Kontrollzellen.

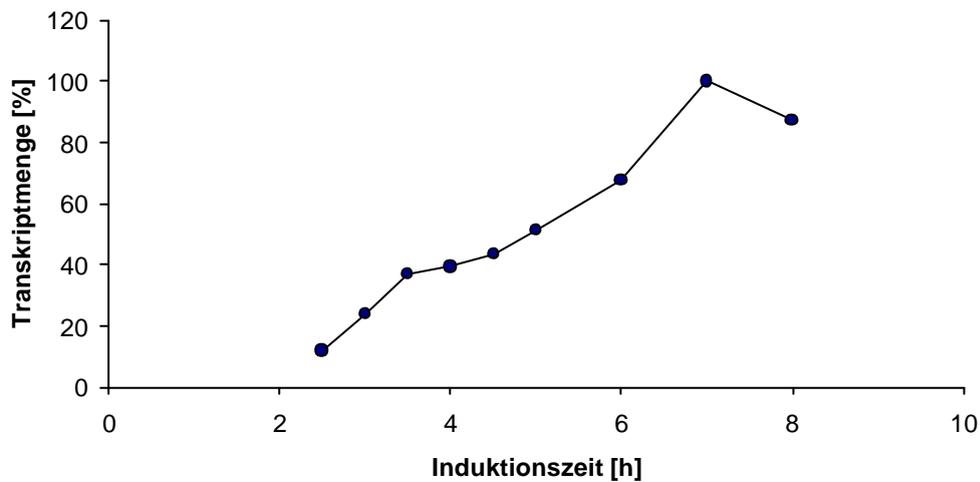


Abbildung 38: Quantifizierung der BMT-Transkriptmenge in *A. majus* Zellen nach Induktion mit *Pmg*-Elicitor

Die Transkriptmengen sind auf den bei 7 h ermittelten Wert (100 %) bezogen.

Bei der COMT hatte bereits die Messung der Enzymaktivität aus der Pflanze ergeben, dass dieses Enzym nicht durch Elicitor induziert wird. Die spezifische Aktivität blieb über einen Zeitraum von 8 h annähernd konstant (2,4-3,0 $\mu\text{kat}/\text{kg}$). In der Literatur sind sowohl elicitierbare (Gowri *et al.*, 1991; Pellegrini *et al.*, 1993) als auch nicht-elicitierbare COMTn wie z.B. in *Nicotiana tabacum* (Martz *et al.*, 1998) beschrieben. Eine Änderung der COMT-Transkriptmenge nach Induktion konnte deshalb nicht erwartet werden, was durch Northern-Analyse bestätigt wurde (nicht gezeigt). Auch das COMT-ähnliche Protein (COMT2) zeigte im Northern-Blot keine Induzierbarkeit.

Im Falle der CCoAOMT konnte bereits durch Messung der Enzymaktivität aus der Zellkultur dargestellt werden, dass dieses Enzym durch Elicitor induziert wird (Maximum nach 8 h: 2,96 $\mu\text{kat}/\text{kg}$). CCoAOMTn sind wie die BMT an der induzierten Abwehr der Pflanze beteiligt. Sie sind jedoch nicht in die Synthese von Phytoalexinen involviert, sondern in die Bildung lignin-ähnlicher Polymere zur Verstärkung der Zellwände (Kneusel *et al.*, 1989; Kühnl *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1991; Busam *et al.*, 1997; Grimmig & Matern, 1997).

Die CCoAOMT-Sonde hybridisierte nicht mit den Transkripten der anderen OMTn. Nach einer Verzögerung von ca. 1 h stieg die Transkriptmenge stetig an und zeigte ein Maximum bei 3,5 h, danach fiel sie wieder ab (Abb. 39 u. 40). Auch in anderen Zellkulturen sind CCoAOMTn kurzfristig und transient induzierbar. Die CCoAOMT aus *Vitis vinifera* (Busam *et al.*, 1997) zeigt ein Maximum nach 4 h, die CCoAOMT aus *P. crispum* erst nach 6 h (Schmitt *et al.*, 1991).

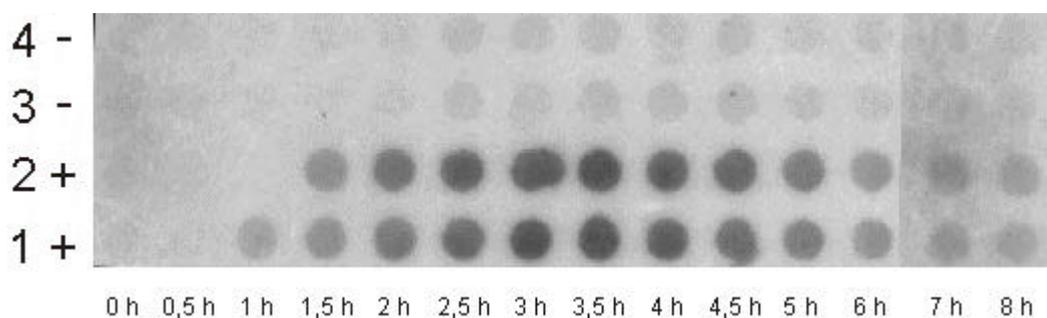


Abbildung 39: Northern-Hybridisierung der CCoAOMT-Transkriptmenge aus elicitierten *A. majus* Zellen

Gesamt-RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elicitorung (0-8 h) aus *A. majus* Zellen und aus nicht-induzierten Kontrollzellen isoliert, und jeweils 4 μg wurden für die Northern-Hybridisierung mit einer BMT-spezifischen ^{32}P -markierten Sonde (Rediprime™ II-random prime labeling system; Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) eingesetzt. Spuren 1+, 2+: RNA aus elicitierten Zellen; Spuren 3, 4: RNA aus Kontrollzellen.

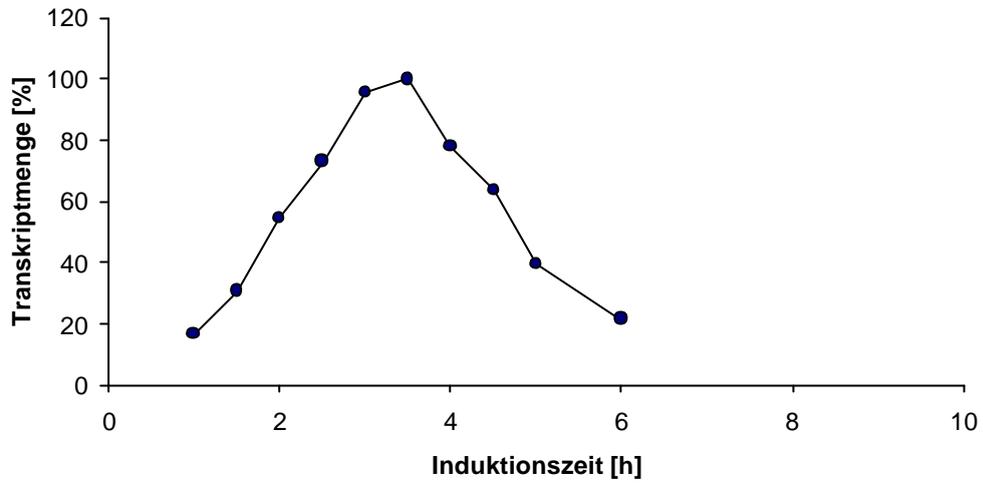


Abbildung 40: Quantifizierung der CCoAOMT Transkriptmenge in *A. majus* Zellen nach Induktion mit *Pmg*-Elicitor

Die Transkriptmengen sind auf den bei 3,5 h ermittelten Wert (100 %) bezogen.

D.5 Heterologe Expression

D.5.1 Klonierung in den Expressionsvektor

Um eine gerichtete Klonierung in den pQE60-Expressionsvektor zu ermöglichen, wurden mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide eine *Nco*I- Schnittstelle am Translationsstart und eine *Bam*HI-Schnittstelle nach dem Stopkodon in die cDNA eingeführt (**Tab. 9**).

Tabelle 9 Oligonukleotide zur Einführung von *Nco*I- und *Bam*HI-Schnittstellen

Sequenz	Name	Oligonukleotid
BMT	6.1 <i>Nco</i> Anfang	5'- GCC AAA ACT GAA <u>TCC</u> ATG GCA G -3'
	GSP16 <i>Bam</i> HI	5'- CAA <u>AGG ATC CTG</u> GAA CAA TCT TCC TTC C -3'
COMT	COMT24univers	5'- CAA TTC TCC CAC <u>CAT</u> GGA TAC CAC TAC G -3'
	COMT24revers	5'- CAA <u>AGG ATC CAA</u> AGC TCC CAA GGA TTT ATC ATC -3'
COMT2	GSP30	5'- CCA AAC <u>CAT</u> GGC TTC CCA TGA TCA AGA AGC -3'
	GSP31 <i>Bam</i> HI	5'- CAA <u>AGG ATC CGT</u> AGG GCA TAG GAA AAG GCA AC -3'
CCoAOMT	CaffCoA <i>Nco</i> Anfang	5'- CAC CAT ATT <u>TCC</u> CAT GGC TTC TAA TGG -3'
	GSP25 <i>Bam</i> HI	5'- CAA <u>AGG ATC CAT</u> CAA TAA TGC ACA TTG C- 3'

Die *Nco*I- („CCATGG“) und die *Bam*HI-Schnittstellen („GGATCC“) sind unterstrichen; die zur Einführung der *Nco*I-Schnittstellen eingeführten Basen sind fett gedruckt. Die Oligonukleotid-Primer wurden zur Gewinnung vollständiger Sequenzen mit eingebauten Restriktionsstellen mittels PCR-Technik verwendet.

Interne *Nco*I-Schnittstellen in COMT, COMT2 und CCoAOMT wurden durch *in vitro*-Mutagenese entfernt. Dies wurde mit der PCR-Technik (QuikChange[®] Multi Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, Heidelberg) mit Mutageneseprimern (**Tab. 10**) ohne Änderung der Aminosäuresequenz erreicht (**C.4.10**).

Tabelle 10: Oligonukleotide zum Entfernen interner *Nco*I-Schnittstellen

Sequenz	Oligo	Sequenz
COMT	COMT24Mutagenese	5'- GGG TCT TTG <u>CCG TGA</u> TAC TCA AAT GCT G -3'
COMT2	9.4 <i>Nco</i> Intern	5'- CCT CTC TCT TCC <u>CCC GTG TGT</u> ATA TAT CAA CAT GC-3'
CCoAOMT	CaffCoA <i>Nco</i> -Intern1	5'- GTC ATC AGA TTC <u>CAC GGA</u> TGC TTG G -3'
	CaffCoA <i>Nco</i> -Intern2	5'- CAC CAA TTT <u>CCA TCG</u> TGT TCT TGG C-3'

Die Nukleotide im Bereich der zu entfernenden *Nco*I-Schnittstelle sind unterstrichen, die ausgetauschten Basen sind fett gedruckt.

Die Insertion der cDNAn in die *Nco*I-Schnittstelle des pQE60-Vektors ermöglichte die Expression der OMTn vom vektoreigenen Start-ATG nach Transformation in *E. coli*-M15. Die Expression wurde durch Zusatz von IPTG induziert und fand bei 37°C mit einer Induktionsdauer von 3 h statt. Als Kontrollen wurden Kulturen ohne IPTG als Induktor und Ansätze, die nur den leeren Vektor ohne Insert enthielten, eingesetzt. Für die heterologe Expression von Enzymen in diesem System ist bekannt, dass die induzierten Zellen durch die Expression in ihrem Wachstum gehemmt werden. Dieses Phänomen trat bei allen vier Enzymen auf.

D.5.2 SDS-PAGE der rekombinanten Enzyme

Die induzierten Bakterien wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und die resultierenden Rohextrakte über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie Brilliant Blue Färbung konnte in dem Rohextrakt der induzierten BMT-pQE60 Transformanten lediglich eine schwache Proteinbande bei etwa 39 kDa detektiert werden (nicht gezeigt). Diese war für die rekombinante BMT aus *A. majus* aufgrund der Berechnung der kalkulierten Molekularmasse zu erwarten. Durch Szintillationszählung konnte die Umsetzung des Bergaptols gemessen werden. Der Rohextrakt induzierter Transformanten zeigte eine spezifische Aktivität von 2,55 μ kat/kg, der Extrakt nicht-induzierter Transformanten 1,167 μ kat/kg. Dieser geringe Aktivitätsunterschied bestätigt die Vermutung, dass die induzierte Expression gering war und auch ohne Induktion geringe Mengen an rekombinantem Protein produziert werden.

In den Rohextrakten der induzierten COMT- und COMT2-Transformanten konnte ebenfalls nur eine schwache zusätzliche Bande bei 40 kDa bzw. 39 kDa detektiert werden

(nicht gezeigt). Durch Szintillationszählung wurde die Umsetzung der Kaffeesäure durch die COMT gemessen. Der Extrakt induzierter Transformanten zeigte eine spezifische Aktivität der COMT von 1,6 $\mu\text{kat}/\text{kg}$, der Rohextrakt nicht-induzierter Transformanten nur 99,1 nkat/kg. Der COMT2 konnte keine Funktion zugeordnet werden. Mit keiner der unter (B.3) aufgelisteten Substanzen aus dem Cumarin- und Furanocumarin-, dem Lignin- und Flavonoidstoffwechsel konnte Enzymaktivität festgestellt werden.

Der Extrakt der induzierten CCoAOMT-pQE60 Transformanten wies eine deutliche Bande bei 27 kDa auf. Im Vergleich dazu zeigten die nicht-induzierten Kontrollzellen nur eine sehr schwache Bande auf gleicher Höhe (Abb. 41). Dies deutete auf eine Überexpression des Enzyms hin. Durch Szintillationszählung konnte die Umsetzung des Caffeoyl-CoA gemessen werden. Die spezifische Aktivität aus den Extrakten induzierter oder nicht-induzierter Transformanten betrug 933 nkat/kg bzw. 865,6 nkat/kg. Die Messungen fanden im linearen Bereich statt und wurden mehrfach durchgeführt. Der nur geringe Unterschied der spezifischen Aktivitäten steht im Widerspruch zur auf dem SDS-Gel gezeigten starken Induktion der Expression, die bei mehrfacher Auftragung verschiedener Proteinmengen stets detektiert wurde.

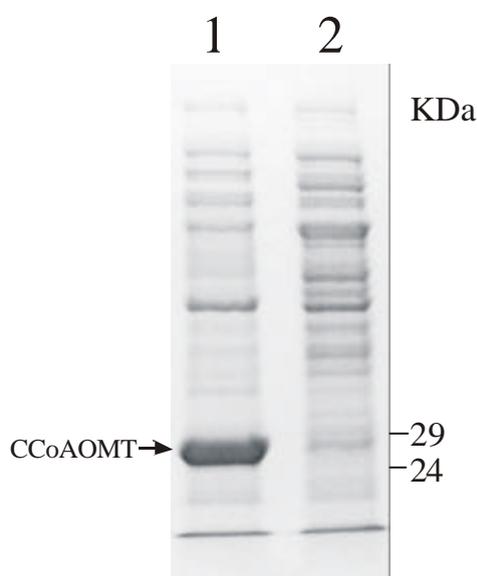


Abbildung 41: Expression von *A. majus* CCoAOMT in *E. coli* M15 [pREP4]

Proteinrohextrakte (16 μg pro Spur) aus IPTG-induzierten *E. coli* pQE60-CCoAOMT (Spur 1) und aus nicht-induzierten *E. coli* pQE60-BMT (Spur 2) wurden in einem 12,5 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Zuordnung der Massen (kDa) ist am rechten Rand dargestellt.

D.5.3 Identität und Substratspezifität der rekombinanten OMTn

Die Identität der rekombinant exprimierten Enzyme wurde zunächst mit einer kleinen Zahl an Substraten und *S*-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin überprüft. Genauere Untersuchungen zur Substratspezifität wurden für die biochemischen Charakterisierungen der BMT und COMT durchgeführt (D.8).

Die Enzymtests wurden zur Identifizierung der Produkte mittels Dünnschichtchromatographie ausgewertet. Die quantitative Auswertung erfolgte nach Ausschütteln mit Ethylacetat durch Szintillationszählung. Hierfür wurden die Proteinextrakte IPTG-induzierter und nicht-induzierter *E. coli*-Zellen in den Standardenzymtests (C.5.2.1-4) mit den entsprechenden Substraten inkubiert. Durch die unterschiedlichen Substratspezifitäten der Enzyme konnte gezeigt werden, dass trotz geringer Induktion der Expression die Produktbildung durch die Enzyme erfolgt und bakterieller Rohextrakt ohne das entsprechende Protein keinen Umsatz macht.

D.5.3.1 BMT

Proteinextrakte induzierter (37,2 µg pro Ansatz) und nicht-induzierter BMT-pQE60 Transformanten (111 µg pro Ansatz) wurden mit den Substraten Bergaptol und Xanthotoxol im Standardenzymtest (C.5.2.1-2) inkubiert. Xanthotoxol konnte nicht zum Xanthotoxin umgesetzt werden, wohingegen Bergaptol als Substrat akzeptiert wurde. Die Identifizierung des Produktes Bergapten erfolgte dünnschichtchromatographisch mit Referenzsubstanzen in verschiedenen Fließmitteln (Tab. 11). Die Chromatogramme wurden mittels Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht (265 nm) ausgewertet. Das radioaktiv markierte Bergapten wurde im Bioimager FLA-2000 von Fuji Photo Film (Tokyo, Japan) verifiziert.

Tabelle 11: Chromatographie von Bergaptol und Bergapten

Furanocumarin	Laufmittel I RF	Laufmittel II RF	Laufmittel III RF	Laufmittel IV RF
Bergaptol	0,52	0,26	0,67	0,34
Bergapten	0,77	0,78	0,78	0,68

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel F₂₅₄-Platten in 67 % Chloroform/33 % Ethylacetat (Laufmittel I), 95 % Chloroform/5 % Methanol (Laufmittel II), 45,5 % *n*-Hexan/45,5 % Ethylacetat/9 % Methanol (Laufmittel III) und 60 % Toluol/40 % Ethylacetat (Laufmittel IV).

D.5.3.2 COMT

Extrakte induzierter (12,3 µg pro Ansatz) und nicht-induzierter COMT-pQE60 Transformanten (42 µg pro Ansatz) wurden mit Kaffeesäure im Standardenzymtest (C.5.2.3) inkubiert. Die Identifizierung der Ferulasäure als Produkt der Umsetzung erfolgte dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Fließmitteln mit authentischen Referenzsubstanzen (Tab. 12). Die radioaktiv markierte Ferulasäure wurde analog zum radioaktiv markierten Bergapten verifiziert.

Tabelle 12: Chromatographie von Kaffeesäure und Ferulasäure

	Laufmittel I RF	Laufmittel II RF	Laufmittel III RF	Laufmittel IV RF
Kaffeesäure	0,033	0,061	0,19	0,03
Ferulasäure	0,1	0,24	0,28	0,11

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel E₅₄-Platten in 67 % Chloroform/33 % Ethylacetat (Laufmittel I), 95 % Chloroform/5 % Methanol (Laufmittel II), 45,5 % *n*-Hexan/45,5 % Ethylacetat/9 % Methanol (Laufmittel III) und 60 % Toluol/40 % Ethylacetat (Laufmittel IV).

D.5.3.3 CCoAOMT

Rohextrakte induzierter (107,4 µg/Ansatz) und nicht-induzierter CCoAOMT-pQE60 Transformanten (172,2 µg/Ansatz) wurden mit Caffeoyl-CoA im Standardenzymtest (C.5.2.4) 30 min bei pH 7,5 und 30°C inkubiert. Die Identifizierung der Feruloyl-CoA als Produkt der Umsetzung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmitteln mit authentischen Referenzsubstanzen (Tab. 13). Das radioaktiv markierte Feruloyl-CoA wurde analog zum radioaktiv markierten Bergapten verifiziert.

Tabelle 13: Chromatographie von Caffeoyl-CoA und Feruloyl-CoA

	Laufmittel I RF	Laufmittel II RF	Laufmittel III RF	Laufmittel IV RF
Caffeoyl-CoA	0	0	0,03	0
Feruloyl-CoA	0,09	0,26	0,3	0,1

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel E₅₄-Platten in 67 % Chloroform/33 % Ethylacetat (Laufmittel I), 95 % Chloroform/5 % Methanol (Laufmittel II), 45,5 % *n*-Hexan/45,5 % Ethylacetat/9 % Methanol (Laufmittel III) und 60 % Toluol/40 % Ethylacetat (Laufmittel IV).

D.6 Partielle Reinigung der BMT

Ziel dieser Versuche war es, die rekombinante BMT aufgrund der apparent geringen Expression präparativ zu reinigen, um das Enzym zu charakterisieren.

D.6.1 Ammoniumsulfatfällung

Die mit BMT-pQE60 transformierten *E. coli*-Zellen wurden mit IPTG induziert und nach dreistündiger Inkubation abzentrifugiert. Die Zellen (5,6 g Feuchtwicht) wurden im Ultraschall aufgeschlossen. Der Rohextrakt (81 mg Protein/40 ml) mit einer spezifischen Aktivität von 2,55 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ wurde durch Ammoniumsulfatfällung von 60 % bis 80 % Sättigung fraktioniert. Diese Fraktion wies nach Entsalzung über PD-10 Säulen (Amersham Biosciences, Braunschweig) eine BMT-Aktivität von 20,2 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ auf.

D.6.2 Chromatographie an Fractogel EMD BioSEC

Das Prinzip der Gelpermeationschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen dem Volumen eines Gelkompartimentes und des umgebenden Mediums. Die Moleküle werden dabei nach ihrer Größe und Form getrennt.

Das Sediment der Ammoniumsulfatfällung wurde in 2 ml des SEC-Elutionspuffers (B.8.7) aufgenommen, auf die Säule (Superperformance-Säule (600 x 16 mm), Gelbettvolumen 117 ml) aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert. Die BMT-Aktivität wurde im Eluat (1,5 ml Fraktion) und nach Vereinigung aktiver Fraktionen getestet. Die vereinigten Fraktionen wurden aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

Bei ersten Tests zur biochemischen Charakterisierung des angereinigten Enzyms wurde aus der gleichen Proteinkultur ein Aktivitätsverlust von 55 % im Vergleich zum Test direkt nach SEC-Reinigung festgestellt. Erneutes Einfrieren des Proteinextraktes führte zum weiteren Verlust an Aktivität (3 %). Die Verwendung modifizierter Puffer (Tris-HCl pH 7-8 mit DTT-Zusätzen) und die Veränderung der Parameter der SEC-Aufreinigung konnten das Enzym nicht stabilisieren. Auch weitere Reinigungsversuche über Anionenaustauscher (DEAE; MonoQ) oder Affinitätschromatographie an SAM erbrachten keine Aktivität. Daher erfolgte die biochemische Charakterisierung der BMT aus der entsalzten Ammoniumsulfatfraktion.

Aus *R. graveolens* wurde bereits die Labilität der XMT berichtet, die innerhalb weniger Tage fast 50 % ihrer Aktivität nach Entsalzung über Sephadex G-25 verliert. In diesem Falle blieb die BMT annähernd stabil (Thompson *et al.*, 1978).

Aufgrund der überraschenden Labilität der BMT bei Einfrieren und Lagerung nach nur einem Reinigungsschritt wurden Stabilitätsversuche durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der aktiven Ammoniumsulfatfraktion (60-80 % Sättigung) nach Entsalzung (PD-10; Amersham Biosciences, Braunschweig) bei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur (RT), 4°C, -20°C, -70°C) gelagert. Eine Lagerung bei RT und bei 4°C zeigte über 10 Tage keine Veränderung der Enzymaktivität (**Abb. 42**). Die Ansätze, die bei -20°C und -70°C mit oder ohne vorherigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, wiesen über den Zeitraum von 2 Monaten nur einen sehr geringen Aktivitätsverlust auf (**Abb. 43**).

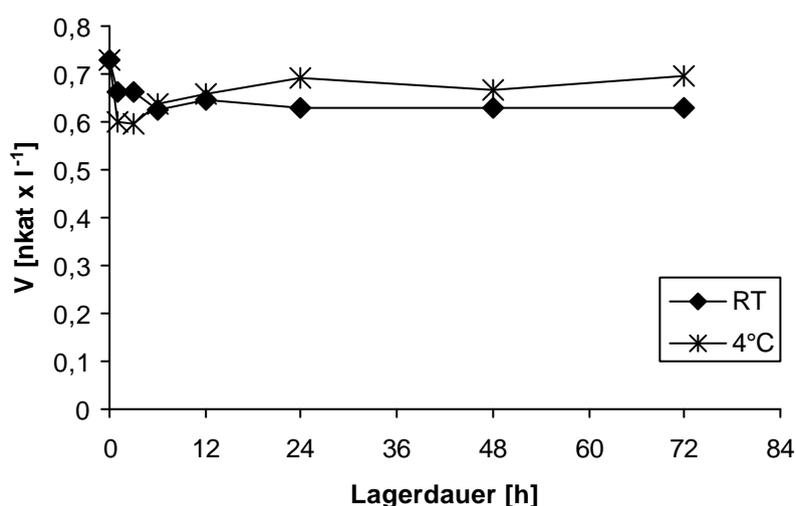


Abbildung 42: Aktivität der BMT unter Lagerung bei Raumtemperatur oder 4°C

Sowohl bei 4°C wie auch bei RT fiel die Aktivität um ca. 20 % innerhalb der ersten 3 h, blieb dann etwa konstant.

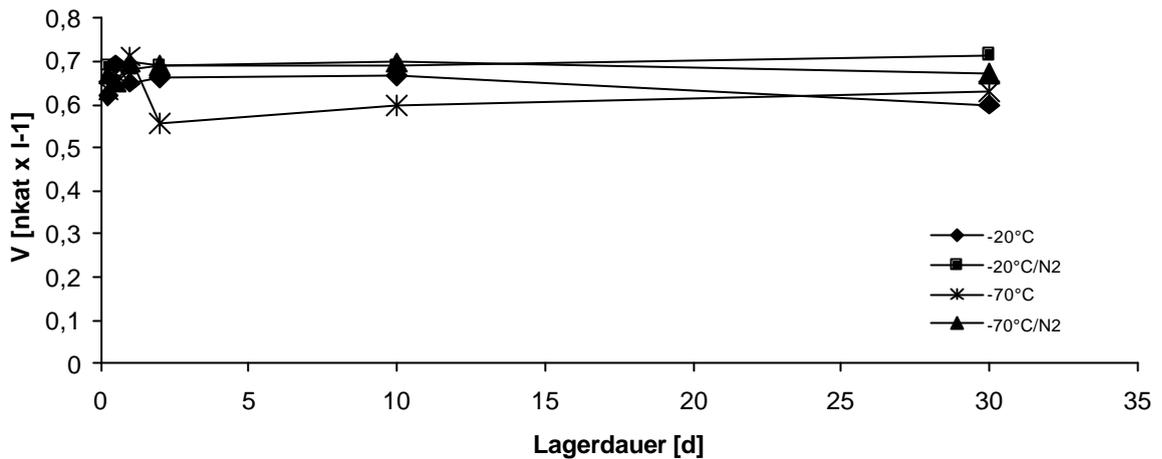


Abbildung 43: Aktivität der BMT unter Lagerung bei -20°C und -70°C mit oder ohne vorherigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff

Die direkt bei -70°C eingefrorene Probe zeigte einen Aktivitätsverlust von ca. 18 % innerhalb der ersten 2 Tage, blieb dann etwa konstant.

Je eine der Proben, die in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C oder -70°C gelagert waren, sowie je eine Probe, die bei -20°C und -70°C eingefroren waren, wurde dreimal aufgetaut und nach Messung der BMT-Aktivität wieder eingefroren. Es konnte nur ein sehr geringer Einfluss auf die Enzymaktivität festgestellt werden (**Abb. 44**).

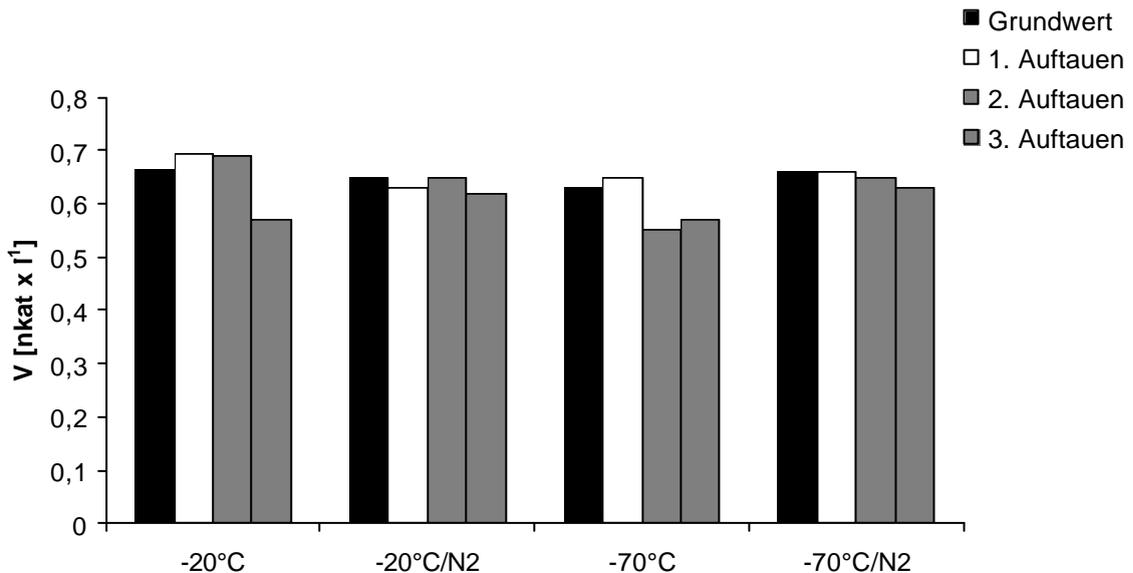


Abbildung 44: Aktivität der BMT nach mehrmaligen Auftau/Einfrier-Zyklen

Nach dreimaligem Auftauen und Einfrieren zeigten die bei -20°C und -70°C eingefrorenen Proben den größten Aktivitätsverlust von 12-15 %.

D.7 Apparente Molekularmasse von BMT und COMT

Im Falle der BMT und XMT aus *P. crispum* (Hauffe *et al.*, 1986) bzw. *R. graveolens* (Thompson *et al.*, 1978) handelt es sich um dimere Enzyme von 73 und 67 kDa (*P. crispum*) bzw. 85 und 110 kDa (*R. graveolens*). Auch andere OMTn, wie COMT, ChOMT und IOMT aus *Medicago sativa* (Zubieta *et al.*, 2001; Zubieta *et al.*, 2002) oder COMT aus *Populus tremuloides* (Meng & Campbell, 1996) liegen als Dimere vor. Ziel dieses Versuchs war es, zu klären, ob BMT und COMT aus *A. majus* Dimere bilden.

Die Chromatographie über eine kalibrierte Fractogel EMD BioSEC-Säule (C.5.3) in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 200 mM NaCl deutete auch hier auf dimere Enzyme hin. Sowohl die BMT als auch die COMT eluierten in einem Volumen, das zwischen den Retentionsvolumina von Ovalbumin (45 kDa) und BSA (67 kDa) lag (Abb. 45). Der errechnete Verteilungskoeffizient (K_{av}) von 0,167 korrelierte zu einer Molekularmasse von 69,3 kDa. Diese Größe liegt zwischen den Massen für das BMT-Monomer (38,7 kDa) und Dimer (77,4 kDa), tendiert jedoch zum Dimer. Für die COMT ergab sich anhand des K_{av} von 0,16 eine Masse von 72,4 kDa. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für das Vorliegen eines Dimers bei theoretischen Massen von 40,15 kDa (COMT-Monomer) und 80,3 kDa (COMT-Dimer).

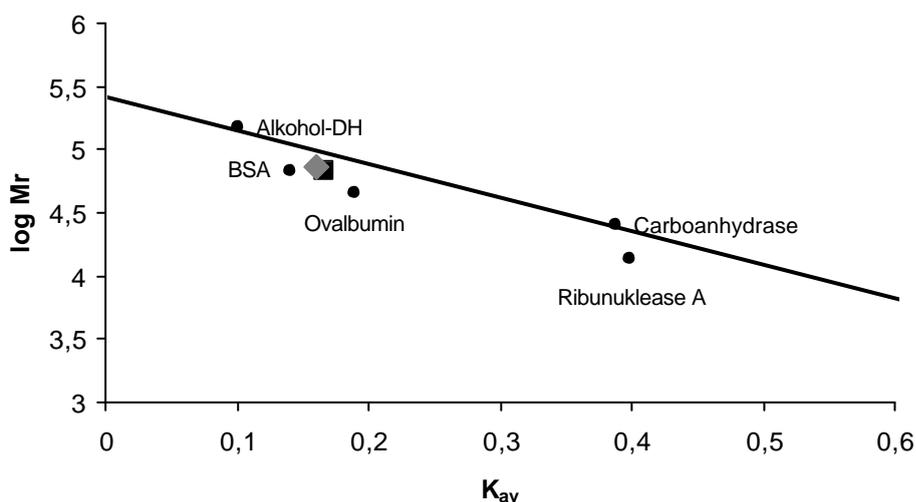


Abbildung 45: Ermittlung der relativen Masse (Mr) von BMT und COMT

Die Enzymlösung nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung (6 mg bzw. 4 mg Protein für die BMT- und COMT-Messung) wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit 200 mM NaCl auf einer kalibrierten Fractogel EMD BioSEC-Säule aufgetrennt. Die lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der K_{av} deutet auf Molekulargewichte von ca. 70 (BMT; ■) bzw. 73 (COMT; ◆) hin. Als Eichproteine dienen Alkoholdehydrogenase (150 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (25 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa). Das Ausschlussvolumen wurde mit Dextran-Blau bestimmt.

D.8 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten OMTn

Für die kinetische Charakterisierung wurde zunächst die Abhängigkeit der Umsatzrate von pH, Temperatur, Zeit und Proteinmenge untersucht. Die Messungen erfolgten unter Zusatz von 1,5 mM Mg^{2+} in Form von $MgCl_2$ nach Hauffe *et al.* (1986). Alle Untersuchungen wurden mit den entsalzten Extrakten nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung durchgeführt.

D.8.1. BMT

D.8.1.1 Kinetische Charakterisierung

Verschiedene Puffersysteme wurden eingesetzt, um den pH-Bereich von 4,0 bis 10,0 zu erfassen (Abb. 46).

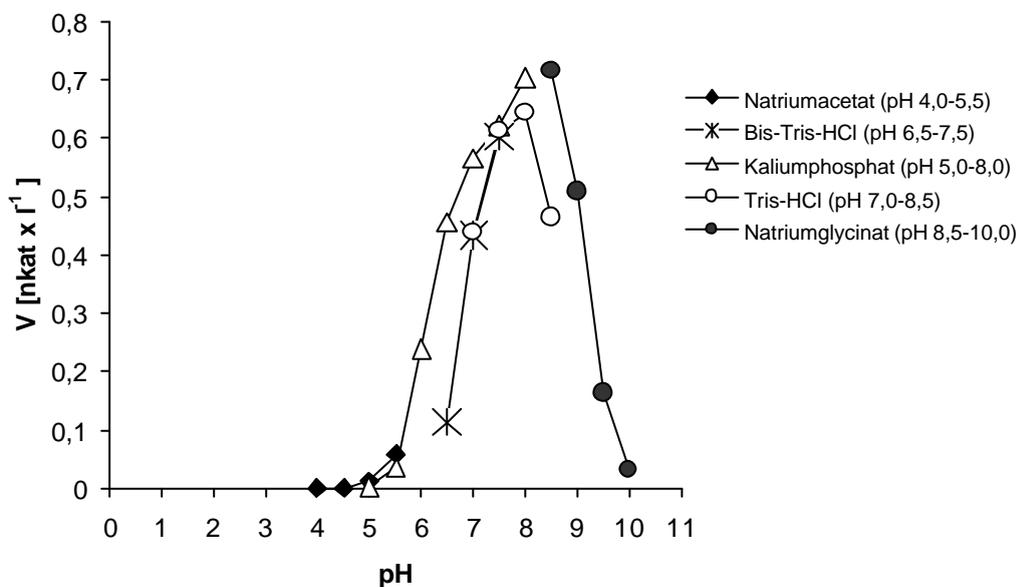


Abbildung 46: Abhängigkeit der BMT-Aktivität vom pH

Die Messungen erfolgten in 200 mM Pufferlösungen bei 35°C mit 1,5 µg Protein/Inkubation.

Die höchste Aktivität der rekombinanten BMT wurde in Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 gemessen (Abb. 46). Dies entspricht den Ergebnissen mit nativer BMT aus *P. crispum* (Hauffe *et al.*, 1986) oder nativer BMT aus *R. graveolens* (Thompson *et al.*, 1978). Alle weiteren Untersuchungen wurden deshalb in Kaliumphosphat pH 8,0 durchgeführt.

Die rekombinante BMT erreichte ihre höchste Aktivität zwischen 35 und 44°C mit einem Maximum bei 42°C (**Abb. 47**). Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Temperatur von 42°C gewählt.

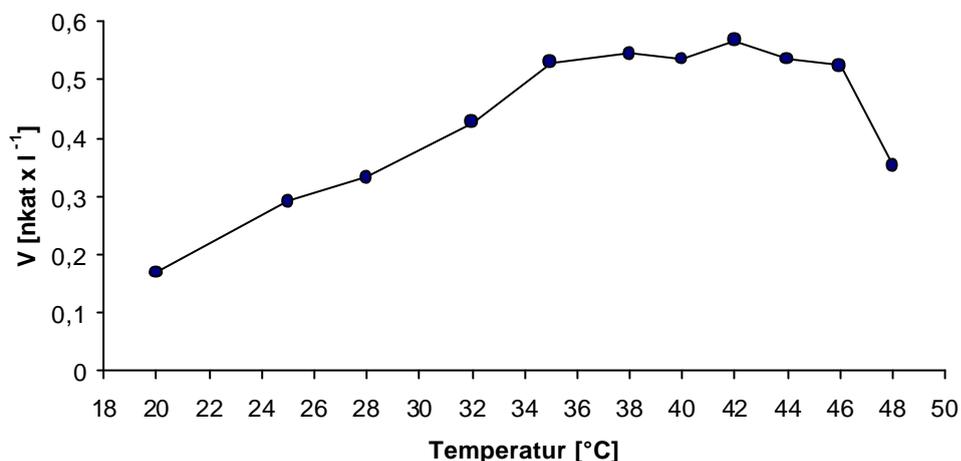


Abbildung 47: Temperaturabhängigkeit der BMT-Aktivität

Die Messungen erfolgten in 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 mit 1,5 µg Protein/Inkubation.

Unter den gewählten Bedingungen (200 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0, 0,9 µg Protein/100 µl Inkubation, 42°C, 250 µM Bergaptol, 40 µM SAM) erfolgte die BMT-Methylierungsreaktion linear über den Versuchszeitraum von 90 min (**Abb. 48**).

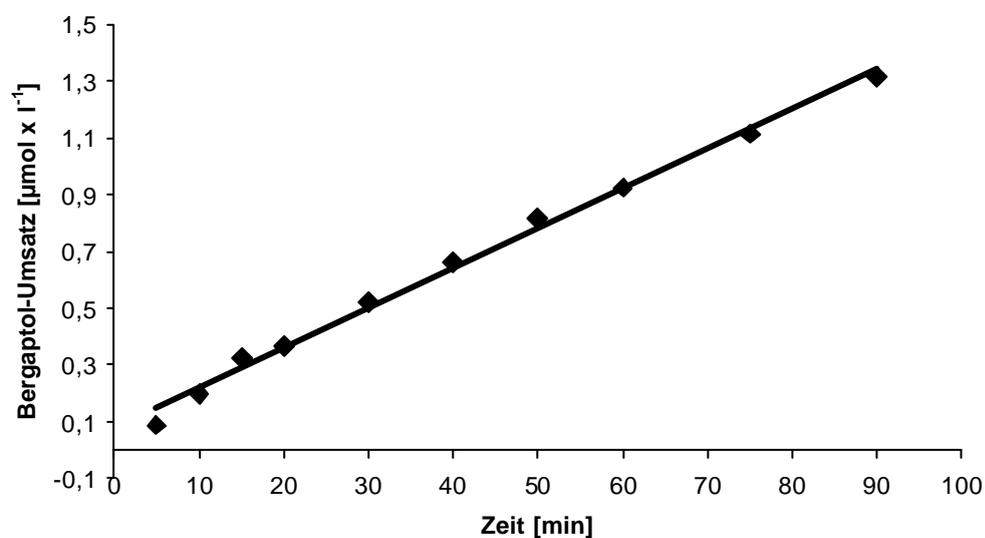


Abbildung 48: BMT-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit

Anschließend wurde die Inkubation auf 20 min begrenzt und unter sonst gleichen Bedingungen die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Proteinmenge gemessen. Es zeigte sich, dass die Enzymtests mit 0,15 bis 3,0 μg Protein linear verlaufen (**Abb. 49**). In den weiteren Tests, mit Ausnahme der Inkubationen zur Magnesiumabhängigkeit, wurden jeweils 1,5 μg Protein eingesetzt.

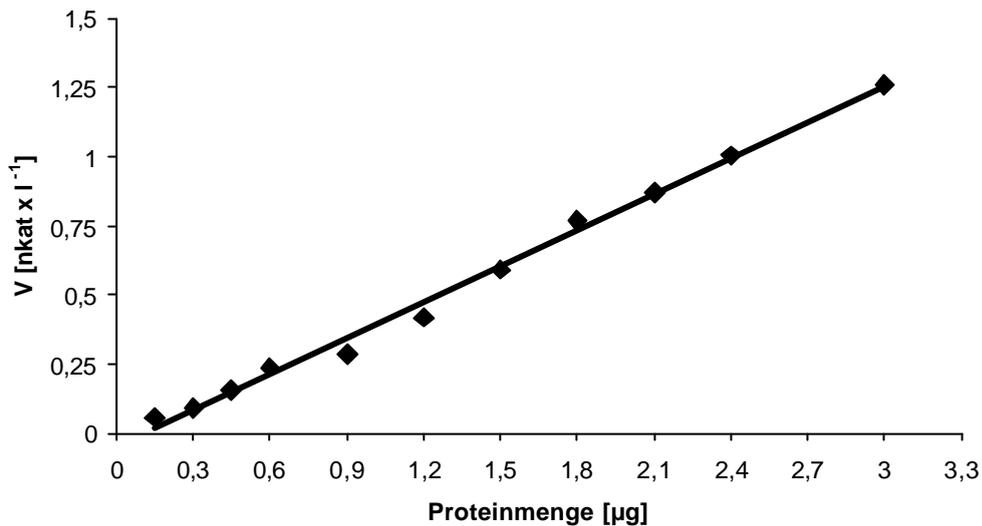


Abbildung 49: BMT-Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymmenge

Der Umsatz in 20 min wurde erfasst.

D.8.1.2 Metallabhängigkeit

Zur Überprüfung, ob Mg^{2+} für die Umsetzung erforderlich ist, wurden Inkubationen ohne Mg^{2+} in Gegenwart gesättigter EDTA-Lösung bzw. unter Zusatz von 0,1 μM -5 mM MgCl_2 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die BMT keine Magnesiumionen erfordert. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da bislang nur CCoAOMTn als magnesiumabhängig beschrieben werden konnten. Alle anderen pflanzlichen OMTn arbeiten unabhängig von Mg^{2+} -Ionen (Ibdah *et al.*, 2003). Für die weiteren Messungen wurde daher auf Magnesiumzusatz verzichtet.

Eine mögliche Beeinflussung der BMT-Umsatzrate durch andere Metallionen wurde mit Konzentrationen von 1,5 mM bzw. 0,1 mM geprüft. Eine erhebliche Verminderung der BMT-Aktivität wurde in Gegenwart von Cu^{2+} (100 % und 51 %) und Ni^{2+} (47 % und 16 %) sowie Co^{2+} (21 % und 10 %) beobachtet (**Abb. 50**). Die native BMT aus *R. graveolens* zeigte dagegen bei Zusatz (Ionen-Konzentration 5,4 mM) von Ni^{2+} und Co^{2+} Hemmungen von 80 %

bzw. 68 %, mit Cu^{2+} bzw. Zn^{2+} eine 100 %ige bzw. 99 %ige Hemmung. Auch Fe^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen setzten die Enzymaktivität um 35 % bzw. 22 % herab (Thompson *et al.*, 1978).

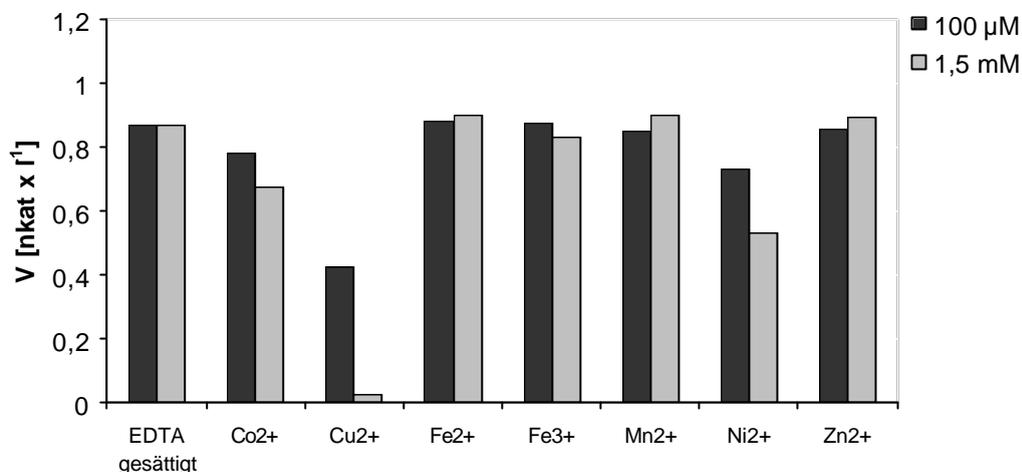


Abbildung 50: Hemmung der BMT-Aktivität durch Metallionen

Die Umsatzrate blieb bei Zusatz gesättigter EDTA-Lösung oder von Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} (0,1 µM/1,5 mM) unbeeinflusst. Die Messungen wurden mit 1,5 µg Protein pro Inkubation durchgeführt.

D.8.1.3 Substratspezifität

Die rekombinante *Ammi majus* BMT wurde unter Standardbedingungen (200 µM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0, 40 µM radioaktiv markiertes SAM, 42°C) mit einer Reihe von potentiellen Substraten (je 250 µM) aus dem Phenylpropan-Stoffwechsel (**B.3**) inkubiert. Keine dieser Substanzen außer Bergaptol wurde umgesetzt.

D.8.1.4 Kinetische Analyse

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zum Substrat und gibt für ein bestimmtes Enzym diejenige Substratkonzentration an, die zu halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit ($1/2 \times V_{\max}$) führt. Für die kinetische Analyse wurde ebenfalls das rekombinante Enzym nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung und Entsalzung (1,5 µg/Inkubation) verwendet und die Inkubationszeit auf 20 min begrenzt. Die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Bergaptol-Konzentration (6,6-40 µM) wurde in Gegenwart von 40 µM SAM gemessen, die Abhängigkeit von der SAM-Konzentration (66-400 nM) wurde in Gegenwart von 0,5 mM Bergaptol verfolgt. Die Auswertung erfolgte

nach Lineweaver-Burk (Abb. 51, 52) und ergab apparente K_m -Werte von 2,8 μM (Bergaptol) und 6,7 μM (SAM). Zum Vergleich wurden die entsprechenden K_m -Werte für die BMT aus *P. crispum* herangezogen, für die 4,0 μM (Bergaptol) und 3,1 μM (SAM) angegeben sind (Hauffe *et al.*, 1986).

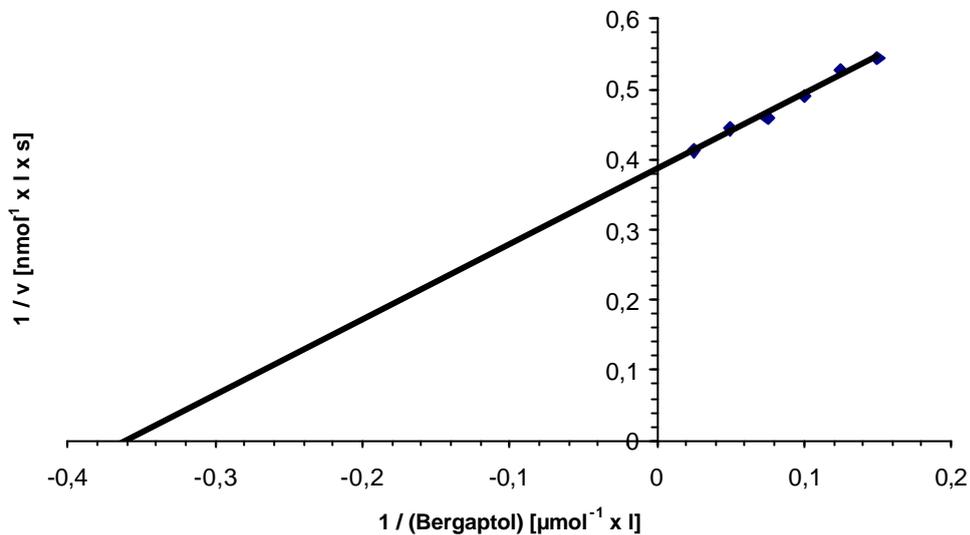


Abbildung 51: Abhängigkeit der BMT-Aktivität von der Bergaptol-Konzentration

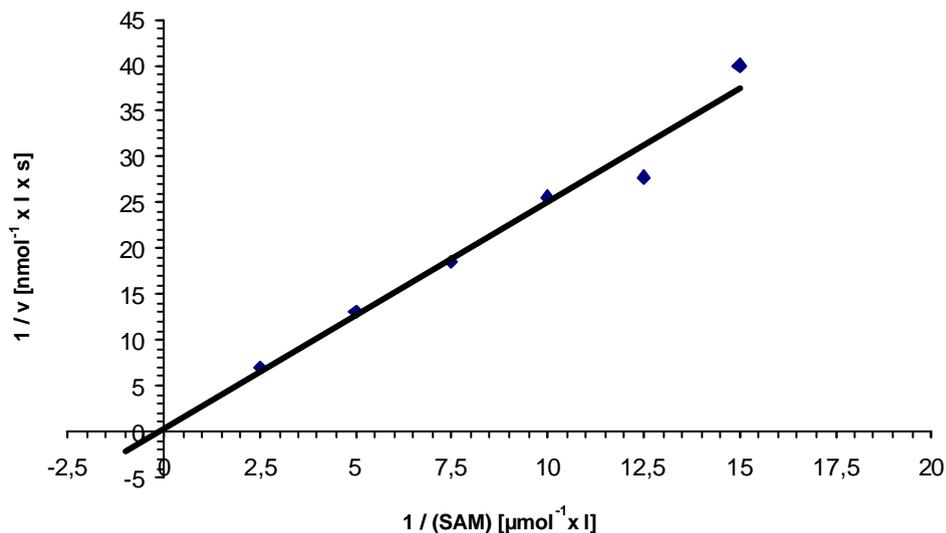


Abbildung 52: Abhängigkeit der BMT-Aktivität von der SAM-Konzentration

Abb. 51-52: Die Auftragung der BMT-Aktivität erfolgte doppelt reziprok nach Lineweaver-Burk gegen die Konzentration an Bergaptol und SAM. Alle Versuchsansätze wurden dreifach bestimmt.

D.8.2 COMT

D.8.2.1 kinetische Charakterisierung

Verschiedene Puffersysteme wurden eingesetzt, um den pH-Bereich von 4,0 bis 10,0 zu erfassen (Abb. 53).

Die höchste Aktivität der rekombinanten COMT wurde in Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gemessen. Dies entspricht den Ergebnissen mit COMTn aus *P. crispum* (pH 7,5) (Hauffe *et al.*, 1986), *M. sativa* (pH 7,0) (Inoue *et al.*, 2000) und *P. tremuloides* (pH 7,6) (Meng & Campbell, 1996). Alle weiteren Untersuchungen wurden deshalb in Kaliumphosphat pH 7,0 durchgeführt.

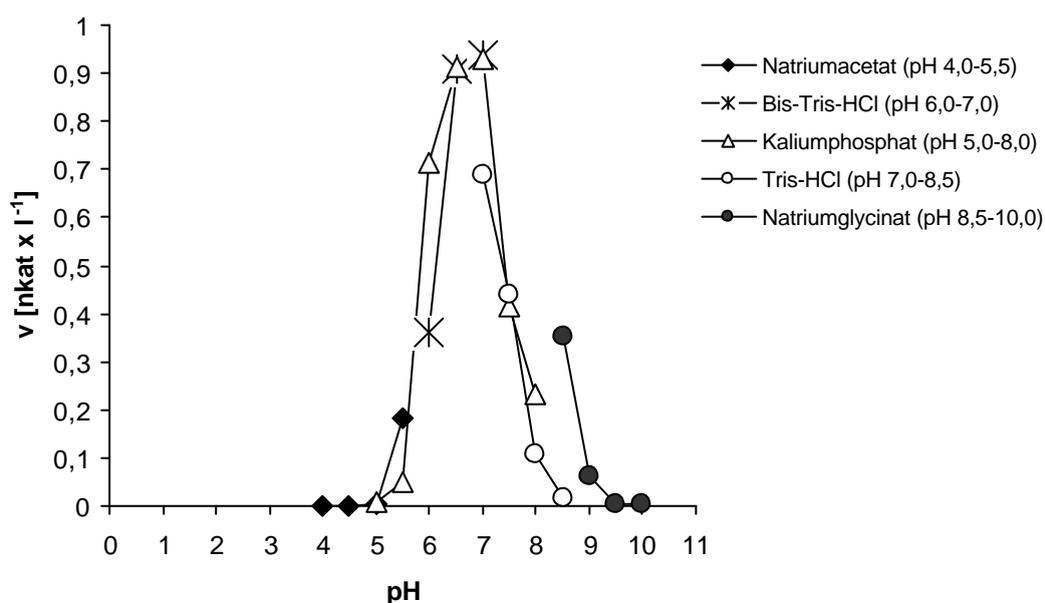


Abbildung 53: Abhängigkeit der COMT-Aktivität vom pH

Die Messungen erfolgten in 200 mM Pufferlösungen bei 35°C mit 5,1 µg Protein/Inkubation.

Die rekombinante COMT erreichte ihre höchste Aktivität zwischen 28 und 35°C mit einem Maximum bei 32°C (**Abb. 54**). Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Temperatur von 32°C gewählt.

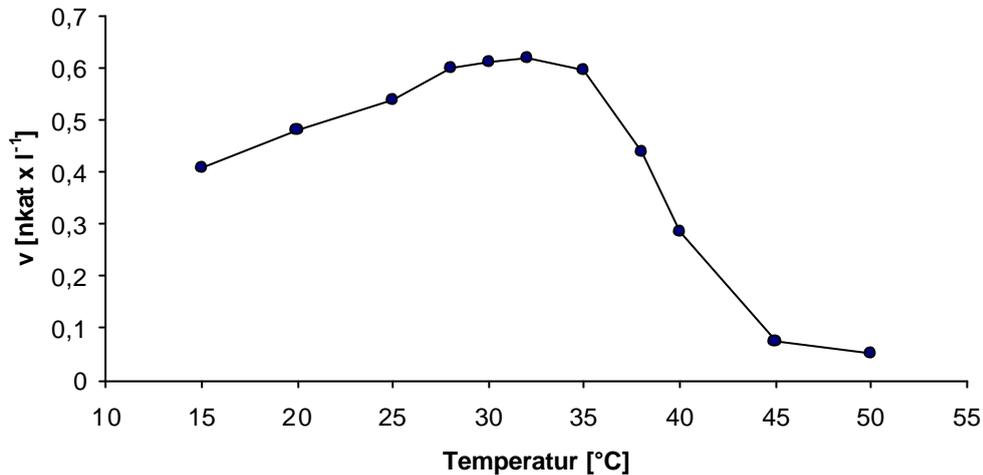


Abbildung 54: Temperaturabhängigkeit der COMT-Aktivität

Die Messungen erfolgten in 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 5,1 µg Protein/Inkubation.

Unter den gewählten Bedingungen (200 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0, 3,0 µg Protein/100 µl Inkubation, 32°C, 250 µM Kaffeesäure, 40 µM SAM) erfolgte die COMT-Methylierungsreaktion linear über den Versuchszeitraum von 90 min (**Abb. 55**).

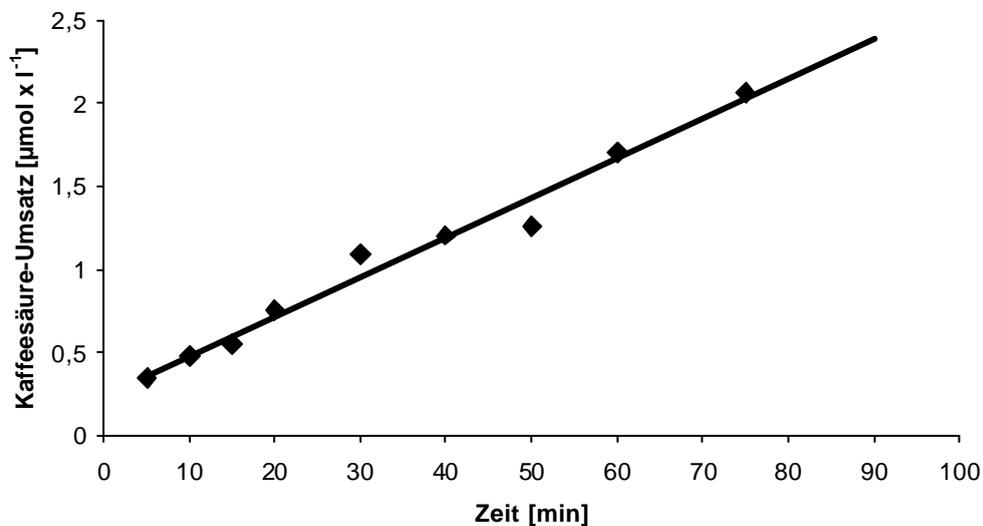


Abbildung 55: COMT-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit

Anschließend wurde die Inkubationszeit auf 30 min begrenzt und unter sonst gleichen Bedingungen die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Proteinmenge gemessen. Es zeigte sich, dass die Enzymtests mit 0,5 bis 10,0 μg Protein linear verlaufen (**Abb. 56**). In den weiteren Tests, mit Ausnahme der Inkubationen zur Magnesiumabhängigkeit, wurden jeweils 5,1 μg Protein eingesetzt.

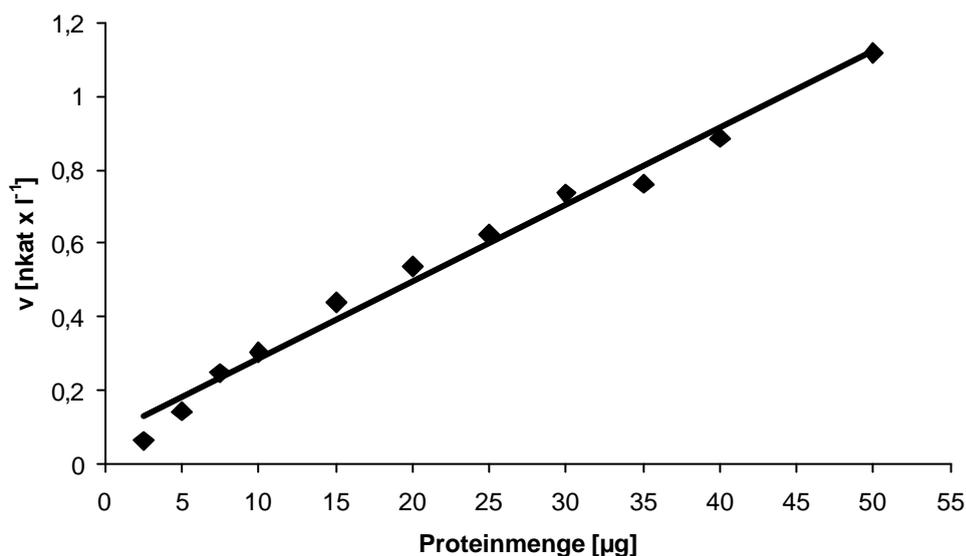


Abbildung 56: COMT-Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymmenge

Der Umsatz in 30 min wurde erfasst.

D.8.2.2 Metallabhängigkeit

Analog zur BMT wurde überprüft, ob Mg^{2+} für die Umsetzung erforderlich ist. Es zeigte sich, dass die *A. majus* COMT keine Magnesiumionen benötigt. Da bislang nur CCoAOMTn als magnesiumabhängig beschrieben werden konnten, während alle anderen pflanzlichen OMTn, einschließlich einer COMT aus *P. tremuloides* (Meng & Campbell, 1996), unabhängig von Mg^{2+} -Ionen arbeiten (Ibdah *et al.*, 2003), war dieses Ergebnis zu erwarten. Für die weiteren Messungen wurde daher auf Magnesiumzusatz verzichtet.

Eine mögliche Beeinflussung der COMT-Umsatzrate durch andere Metallionen wurde mit Konzentrationen von 1,5 mM bzw. 0,1 mM geprüft. Die COMT-Aktivität wurde in Gegenwart von Cu^{2+} zu 100 % gehemmt (beide Konzentrationen), weniger stark durch Ni^{2+} (92 % und 47 %) oder Mn^{2+} (83 % und 8 %). In Gegenwart von Co^{2+} , Fe^{3+} und Zn^{2+} wurde nur eine geringe Hemmung (23-30 % bzw. 0-5 %) beobachtet (**Abb. 57**). Ähnliche Ergebnisse wurden für heterologe OMTn beschrieben (Morishige *et al.*, 2000; Morishige *et al.*, 2002).

Abweichend zeigte die COMT aus *P. tremuloides* nur Hemmungen durch Cu^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} (Meng & Campbell, 1996).

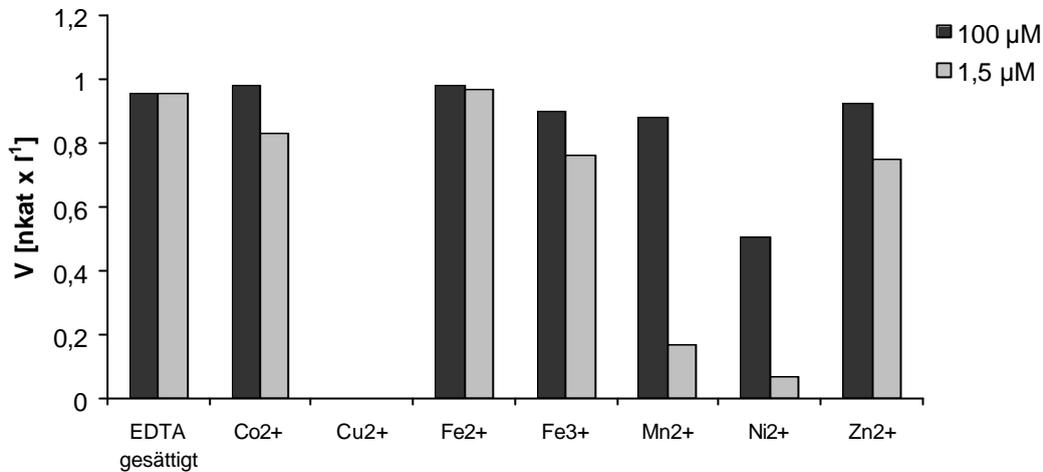


Abbildung 57: Hemmung der COMT-Aktivität durch Metallionen

Die Umsatzrate blieb nur bei Zusatz gesättigter EDTA-Lösung oder Fe^{2+} (100 µM / 1,5 mM) konstant. Die Messungen wurden mit 5,1 µg Protein pro Inkubation durchgeführt.

D.8.2.3 Substratspezifität

Die rekombinante *A. majus* COMT wurde unter Standardbedingungen (200 µM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0, 40 µM radioaktiv markiertes SAM, 32°C) mit einer Reihe von potentiellen Substraten (je 250 µM) aus dem Phenylpropan-Stoffwechsel (**B.3**) inkubiert. Zusätzlich zum Standardsubstrat Kaffeesäure (100 % relative Aktivität) katalysierte die COMT auch die Umsetzung von Caffeoyl-CoA zum Feruloyl-CoA (13,5 %). Außerdem zeigte die COMT katalytische Aktivität mit 5-Hydroxy-Ferulasäure (177 %), Daphnetin (8 %), Esculetin (27 %), Hydrokaffeesäure (10,4 %) und Kaffeesäuremethylester (207 %).

D.8.2.4 Kinetische Analyse

Für die kinetische Analyse wurde ebenfalls das rekombinante Enzym nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung und Entsalzung (5,1 µg/Inkubation) verwendet und die Inkubationszeit auf 20 min begrenzt. Die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Kaffeesäure-Konzentration (10-100 µM) bzw. 5-Hydroxyferulasäure-Konzentrationen (6,6-40 µM) wurde in Gegenwart von SAM in Sättigung gemessen, die Abhängigkeit von der SAM-Konzentration (66-400 nM) wurde in Gegenwart von 0,5 mM Kaffeesäure verfolgt. Die Auswertung erfolgte nach Lineweaver-Burk (**Abb. 58-60**) und ergab apparente K_m -Werte von 121,5 µM (Kaffeesäure), 29,4 µM (5-Hydroxyferulasäure) und 2,0 µM (SAM). Ähnliche K_m -Werte (Kaffeesäure: 40 µM; 5-Hydroxyferulasäure: 19 µM; SAM: 6,2 µM) wurden auch für eine COMT aus *P. tremuloides* gemessen (Meng & Campbell, 1996). Abweichend sind die Ergebnisse von zwei COMTn aus *M. sativa* mit K_m -Werten von 26,0 und 59,5 µM (Kaffeesäure), 3,5 und 4,4 µM (5-Hydroxyferulasäure) und 2,0 µM (SAM) (Inoue *et al.*, 2000; Parvathi *et al.*, 2001).

Alle enzymkinetischen Parameter sind in **Tab. 14** zusammengefasst.

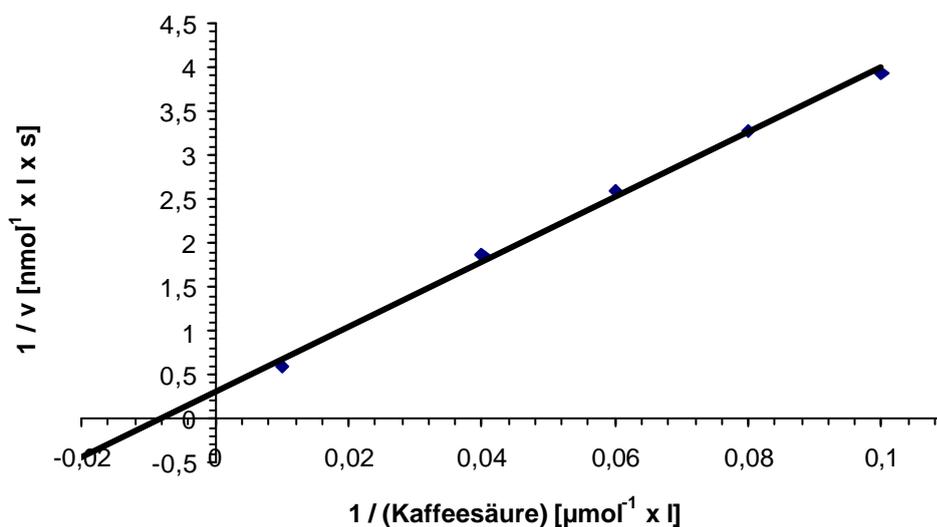


Abbildung 58: Abhängigkeit der COMT-Aktivität von der Kaffeesäure-Konzentration

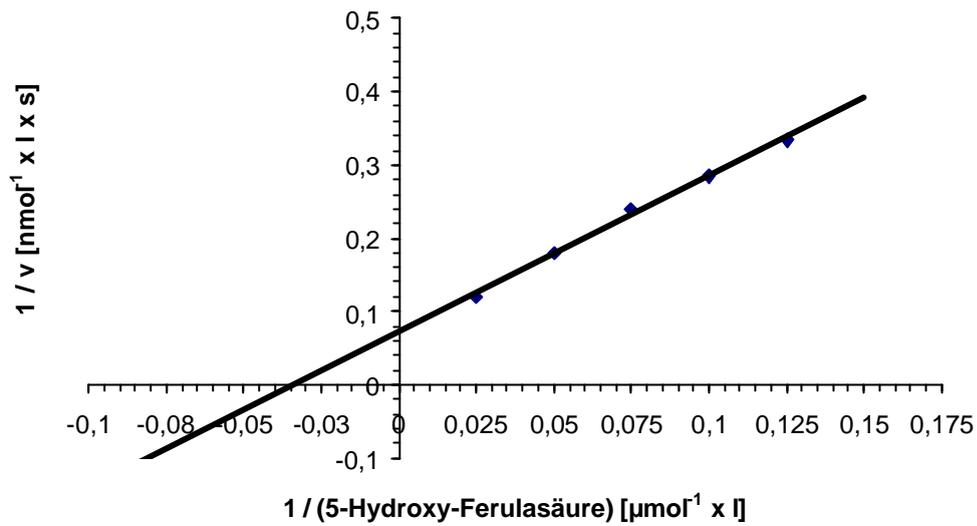


Abbildung 59: Abhängigkeit der COMT-Aktivität von der 5-Hydroxyferulasäure-Konzentration

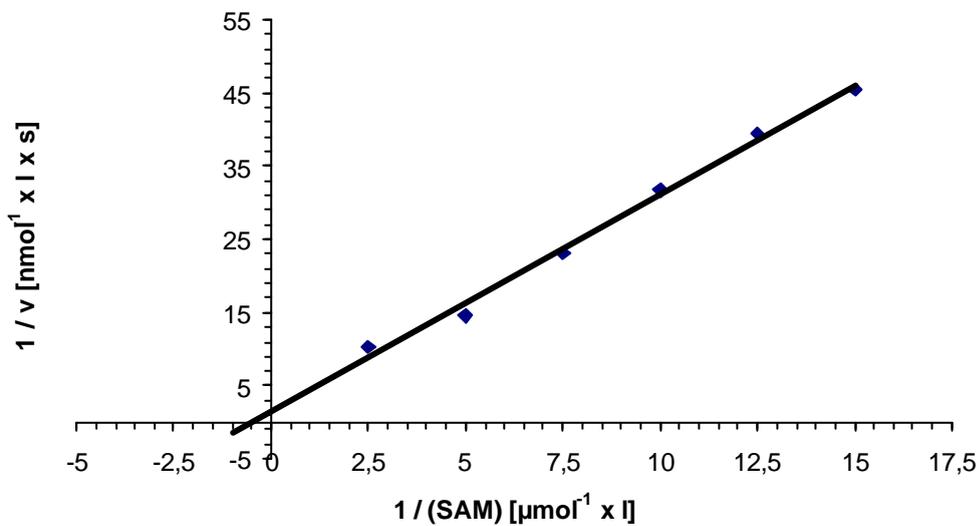


Abbildung 60: Abhängigkeit der COMT-Aktivität von der SAM-Konzentration

Abb. 58-60: Die Auftragung der COMT-Aktivität erfolgte doppelt reziprok nach Lineweaver-Burk gegen die Konzentration an Kaffeesäure, 5-Hydroxyferulasäure und SAM. Alle Versuchsansätze wurden dreifach bestimmt.

Tabelle 14: Kinetische Parameter für *A. majus* COMT

Substrat/Kosubstrat	K_m ($\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)
SAM	2,0
Kaffeensäure	122,0
5-Hydroxy-Ferulasäure	29,0
Caffeoyl-CoA	219,0
Daphnetin	103,0
Esculetin	133,0
Hydrokaffeensäure	2200
Kaffeensäuremethylester	42,0

Alle Bestimmungen wurden mit 5,1 μg Gesamtprotein nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung durchgeführt. Bei der K_m -Bestimmung der Substrate lag SAM in Sättigung vor.

E. Diskussion

SAM-abhängige *O*-Methyltransferasen kommen ubiquitär in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren vor und katalysieren dort sehr unterschiedliche Reaktionen (Ibrahim *et al.*, 1998).

Mg²⁺-abhängige Catechol-OMTn in menschlichen und tierischen Organismen besitzen wichtige Funktionen beim Abbau von körpereigenen Katecholamin-Neurotransmittern sowie Xenobiotika und werden mit breiter Substratspezifität exprimiert. Die pflanzlichen OMTn dagegen methylieren hochspezifisch unterschiedliche Substrate bei gleichzeitig ausgeprägten Homologien auf DNA- und Aminosäureebene. Sie katalysieren beispielsweise Schritte in der Biosynthese von Flavonoiden, Monolignolen und linearen Furanocumarinen (Psoralene).

Furanocumarine kommen vor allem in den Familien der Apiaceae und Rutaceae vor und dienen den Pflanzen als Abwehrstoffe. Bestimmte Insekten haben sich im Laufe der Evolution angepasst, indem sie die Furanocumarine der Pflanzen entgiften und sie doch durch Fraß schädigen (Berenbaum, 2002).

Der spezielle Biosyntheseweg der Psoralene ist aus Vorstufenexperimenten weitestgehend aufgeklärt. Er beginnt mit dem allgemeinen Phenylpropanweg, in dem L-Phenylalanin zu Zimtsäure und 4-Cumarsäure umgesetzt wird. Im späteren Verlauf dieses Biosyntheseweges katalysieren die Bergaptol und Xanthotoxol *O*-Methyltransferasen die Umsetzung zum Bergapten bzw. Xanthotoxin. Beide Enzyme sind aus *P. crispum* L. (Hauffe *et al.*, 1986) und *R. graveolens* L. (Sharma *et al.*, 1979) gereinigt und aus *P. crispum* L. charakterisiert worden. Ihre DNA- und Aminosäuresequenzen jedoch sind bislang nicht publiziert worden. Aus *A. majus* L., aus dem bisher keine OMT beschrieben war, konnten im Rahmen dieser Arbeit vier relevante cDNAs kloniert werden, von denen drei dem Cumarin- bzw. Ligninstoffwechsel zugeordnet werden können.

E.1 Strategien zum Klonieren pflanzlicher OMTn

Es gibt verschiedene Strategien, basierend auf biochemischen bzw. molekularbiologischen Methoden, um OMTn aus Pflanzen zu isolieren. Eine klassische Proteinreinigung wurde für die BMT und XMT aus *P. crispum* und *R. graveolens* vorgenommen. Da man davon ausgehen kann, dass stets mehrere und zudem sehr ähnliche OMTn vorliegen, ist die Auftrennung der Enzyme sehr schwierig. Das Ansequenzieren der aufgereinigten Proteine führt zu Sequenzen, die als Grundlage für degenerierte Oligonukleotide in einer PCR dienen können. Aufgrund der bekannt hohen Sequenzidentität innerhalb der OMTn ist es jedoch unwahrscheinlich, dass über die Primer spezifische cDNA-Fragmente isoliert werden können.

Bemerkenswert waren die von Bugos *et al.* (1991) vorgeschlagenen und von Ibrahim *et al.* (1998) modifizierten fünf Sequenzmotive, die bei allen OMTn (Ausnahme CCoAOMTn) hochkonserviert vorliegen und die man bei der PCR nutzen kann (**Abb. 61**). Bei herkömmlichen RT-PCR-Methoden tritt das Problem auf, dass stets mehrere OMTn amplifiziert werden, da die Transkripte in der Gesamt-RNA nicht unterschieden werden können. Dagegen kann in induzierbaren Systemen die Amplifizierung differentiell durchgeführt werden. Ein solches Beispiel ist die durch pilzliche Elicitoren induzierbare Furanocumarinbiosynthese. Eine unkomplizierte Methode der differentiellen Klonierung stellt die Verwendung unterschiedlich lang induzierter mRNA dar. Mit degenerierten Oligonukleotiden aus den konservierten Regionen kann in Abhängigkeit vom Induktionsoptimum der gesuchten Enzyme eine erhöhte Anzahl verschiedener cDNA-Fragmente angereichert werden. Diese Methode ist jedoch nur begrenzt diskriminierend, da eine Abtrennung zwischen nicht-induzierter mRNA und induzierter mRNA nicht möglich ist. Nur die Anzahl der Kopien induzierbarer Gene in Relation zu den nicht-induzierten erhöht sich.

Methoden wie die substraktive Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen und die „Representational Difference Analysis“ (RDA) machen eine Abtrennung induzierbarer Gene von konstitutiv vorhandenen Genen möglich. Die substraktive Hybridisierung beruht auf der Paarung komplementärer Nukleinsäuren aus zwei differentiellen Populationen. Die Abtrennung erfolgt chromatographisch, wobei einzelsträngige Nukleinsäuren weniger stark an das Säulenmaterial binden als doppelsträngige. Die nicht-induzierten Gene können so als Hybride aus dem Ansatz entfernt werden. Ähnlich ist die auf PCR basierende RDA-Technik. Die cDNA induzierter und nicht-induzierter Zellen oder auch DNA von zwei unterschiedlichen Genomen wird getrennt

extrahiert, mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und in einer PCR amplifiziert. An die Fraktion, die das differentielle Gen enthält, werden Adapter ligiert und die Fraktionen anschließend vereinigt. Die sich entsprechenden Fragmente der beiden Fraktionen hybridisieren miteinander. In einer PCR, in der der Adapter zur Amplifizierung benutzt wird, nehmen nur die differentiellen mit sich selbst hybridisierten Sequenzen exponentiell zu, da nur sie den Adapter enthalten.

E.2 Klonierung von OMTn aus *Ammi majus* L.

Da das Ziel der Arbeit in der Sequenzaufklärung mehrerer OMTn bestand, wurde anstatt der klassischen Enzymreinigung der direkte Weg über die Klonierung induzierbarer und nicht-induzierbarer OMTn gewählt.

Für die OMTn der Furanocumarinbiosynthese, die die Bildung des Bergapten, Xanthotoxins und Isopimpinellins katalysieren, waren keine Vergleichssequenzen bekannt. Aus den fünf hochkonservierten Regionen können aber degenerierte Primer abgeleitet werden. Bei der RT-PCR-Strategie zur Erfassung der BMT und XMT wurde RNA aus 5 h mit *Pmg*-induzierten Zellen eingesetzt, um die induzierbaren OMTn der Furanocumarine von konstitutiv exprimierten OMTn wie den COMTn zu unterscheiden. Die Induktionszeit von 5 h steht in Relation zu den mRNA-Maxima der vorgeschalteten C4H (Hübner *et al.*, 2003) und der 6-C-Prenyltransferase (Hamerski *et al.*, 1990b) mit 3,5 h bzw. 5-6 h und den aus Induktionsversuchen ermittelten Aktivitätsmaxima von 8-11 h für BMT und XMT aus *A. majus*.

Als Ausgangsmaterial der RT-PCR für die COMT wurde nicht-induzierte RNA aus der Pflanze verwendet, da diese im Gegensatz zu Suspensionskulturzellen eine höhere Aktivität des Enzyms zeigte. Dies wies auf eine zur Klonierung ausreichend hohe mRNA-Transkriptmenge hin.

PCR-methodisch wurde ein PCR-Protokoll mit einer sehr niedrigen „annealing“-Temperatur (40°C) mit den von Dumas *et al.* (1992) entwickelten und von Frick & Kutchan (1999) modifizierten degenerierten Primern verwendet. Diese wurden von der Konsensusregion des Motivs I nach Ibrahim *et al.* (1998) und einer zweiten hochkonservierten Region abgeleitet. Die zweite hochkonservierte Region beinhaltet u.a. das an der Deprotonierung der Hydroxylgruppe des Substrates beteiligte Histidin. Mit dieser Methode gelang die Klonierung von drei cDNA-Fragmenten, jeweils einem aus induzierter,

nicht-induzierter und aus der Pflanze isolierter mRNA. Ein viertes Fragment wurde dankenswerterweise von Frau Silvia Specker zur Verfügung gestellt.

Die Generierung vollständiger cDNA-Klone erfolgte mittels RACE-Techniken. Während mit dem 3'-RACE alle cDNA-Fragmente bis zum C-terminalen Ende verlängert werden konnten, ergaben sich Schwierigkeiten bei der Erfassung des N-Terminus zweier cDNA-Fragmente mittels 5'-RACE. Grund dafür mag ein im Verhältnis zu den zwei anderen Sequenzen erhöhter Cytidin-Anteil im Bereich des N-Terminus sein. Beim 5'-RACE mit *C-tailing* wird an das 5'-Ende der Sequenz eine Kette von dCTP angeknüpft. Die Primer, die an diese dCTP-Reste binden sollen, können fälschlicherweise auch in den Cytidin-reichen Teilen der Sequenz am N-Terminus binden und die Isolierung des gesamten 5'-Bereichs inklusive Startkodons erschweren.

Durch das RLM-RACE (RNA Ligase-Mediated Rapid Amplification of cDNA ends) konnten diese Sequenzen vollständig amplifiziert werden. Durch Anwendung dieser zwei Methoden konnten so insgesamt vier verschiedene vollständige cDNA-Klone isoliert werden.

E.3 Expression der OMTn in *E. coli*

Die Klone mit vollständigem ORF wurden zur Expression eingesetzt, um die Funktion der Enzyme nach Möglichkeit aufzuklären und eine biochemische Charakterisierung durchzuführen. Zur Expression der Klone wurden zwei verschiedene Systeme getestet, *E. coli* und Hefe, wobei die Expression in *E. coli* am gebräuchlichsten ist.

Die Expression fand im heterologen System *E. coli* M15[pREP4]/pQE60 statt. Anschließende Inkubationen führten zur Identifizierung von BMT, COMT und CCoAOMT-Aktivitäten. Es konnte festgestellt werden, dass die COMT2 keine Funktion in den Biosynthesen der Flavonoide, Monolignole und Furanocumarine besitzt.

Die Expression erwies sich mit Ausnahme der CCoAOMT als sehr schwach, und auch die Induktion mit IPTG brachte keine Steigerung. Die Auftrennung der Enzymextrakte über eine SDS-PAGE zeigte nur sehr geringe Unterschiede in der Bandenintensität induzierter und nicht-induzierter Extrakte. Dies spiegelte sich auch in den spezifischen Aktivitäten der Enzyme wider. Ohne Induktion kann theoretisch keine Expression der rekombinanten OMTn erfolgen. Das bedeutet, dass der Promotor „leaky“ war und somit auch ohne Induktion heterologes Protein bildete. Für die CCoAOMT konnte dagegen aus dem Rohextrakt der induzierten Bakterien eine ausgeprägte Bande bei 27 kDa detektiert werden und nur eine schwache Bande auf gleicher Höhe in den Gelspuren der nicht-induzierten Kontrollzellen.

Widersprüchlich ist die sowohl in induziertem (933 nkat/kg) als auch nicht-induziertem Zustand (865 nkat/kg) niedrige spezifische Aktivität. Caffeoyl-CoA ist kommerziell nicht verfügbar. Das Substrat stand aus früheren Arbeiten des Arbeitskreises zur Verfügung. Die nur geringe Konzentration des Caffeoyl-CoA kann die Aktivität im Test begrenzt haben. Es ist auch nicht auszuschließen, dass ein Großteil des Enzyms nicht aktiv war.

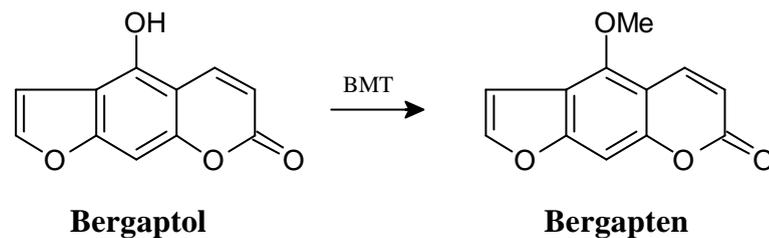
Eine schwache Expression von OMTn ist allerdings üblich (J. Schröder & R. Lukacin, persönliche Mitteilung). Der gewählte Expressionsvektor pQE60 (Qiagen, Hilden) unterstützt dies durch seine im Vergleich zu anderen Systemen schlechteren Induziereigenschaften (O. Panajotow, AG Prof. A. Batschauer, Fachbereich Biologie, Universität Marburg, persönliche Mitteilung). Diesem System wurde aber aufgrund der guten Klonierungs- und Ligationseigenschaften und der sicheren, wenn auch schwachen, Expression der Vorzug gegeben. Das ebenfalls verwendete pET-TOPO-System (Invitrogen, Leek, Niederlande) ermöglicht zwar die direkte Ligation eines cDNA-Klons in den Vektor, diese stellte sich jedoch als äußerst schwierig heraus. Trotz korrekt einkloniertem Insert konnte eine Expression und anschließende Enzymaktivität nicht beobachtet werden. Auch Klonierungen anderer Enzyme mit diesem System zeigten keine Aktivität (Endler, Burga; persönliche Mitteilungen). In der Regel erweisen sich pET-Vektorsysteme aber als sehr effektiv in der Produktion großer Mengen heterologen Proteins (Meng & Campbell, 1996).

Eine Möglichkeit die Expression in *E. coli* zu verbessern kann in der Kultivierung der Bakterien bei suboptimalen Bedingungen d.h. unterhalb von 37°C oder der Veränderung der Konzentration des Induktors bestehen (Kopetzki *et al.*, 1989). Hierdurch wird die Ausbeute an nativ gefalteten Spezies durch geringere Aggregation der Proteine verbessert. Die verlangsamte Protein-Syntheserate kann aber auch zu einer deutlichen Abnahme der Expression führen (Wellmann, 2002).

Als zweites System wurde die Expression in Hefe getestet. Der Stamm INVSc1 (Invitrogen), der nur die Hefe-eigene Reduktase enthält, wurde mit pYES2.1/V5-His-TOPO transformiert. Dieses System eignet sich vor allem für die Expression von Cyt P450, die eine Reduktase zum Elektronentransfer benötigen. Da die BMT in Hefe keine Aktivität zeigte und die Expression in *E. coli* besser zu handhaben ist, wurde die Expression in Hefe nicht weiter verfolgt.

E.4 Bergaptol *O*-Methyltransferase

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die BMT, die einen der letzten Schritte in der Furanocumarinbiosynthese katalysiert und deren Aktivität bereits aus *R. graveolens* (Thompson *et al.*, 1979) und später aus Zellkulturen von *P. crispum* (Hauffe *et al.*, 1986) beschrieben worden war.



Nachdem die vier OMTn aus *A. majus* L. in den Expressionsvektor ligiert worden waren, wurden sie auf Funktionalität getestet. Datenbankanalysen der BMT-Sequenz deuteten auf eine COMT hin, allerdings mit einer geringeren Identität als die verglichenen COMTn untereinander. Auf eine starke Ähnlichkeit der BMT aus *P. crispum* zu heterologen COMTn wurde bereits vorher hingewiesen (Ibrahim *et al.*, 1998). Datenbankvergleiche zeigten eine auffällig hohe Homologie der BMT vor allem mit COMTn aus *Coffea canephora*, *Catharanthus roseus*, *Capsicum annuum*, *Ocimum basilicum* und *Prunus dulcis*. Eine Konsensussequenz der COMTn wies eine Ähnlichkeit von 69,7 % zur BMT auf.

Da bereits drei pflanzliche OMTn kristallisiert worden sind und konservierte Motive innerhalb der OMT-Sequenzen ausreichend diskutiert wurden, konnte die BMT-Sequenz ausgiebig untersucht werden. Die mit der BMT vergleichbaren kristallisierten pflanzlichen OMTn (Zubieta *et al.*, 2001, 2002) liegen als Homodimere vor. Im Bereich des N-Terminus befindet sich das Motiv A [VVAMQLATSTVLPM], das zusammen mit Motiv B [HLDAILMAYVPG] (C-Terminus) des anderen Monomers die Substrattasche ausbildet und die Substratspezifität mitbestimmt (**Abb. 61**). Aus diesem Grund scheint die dimere Struktur essentiell für die Aktivität der Enzyme *in vivo* und *in vitro* zu sein.

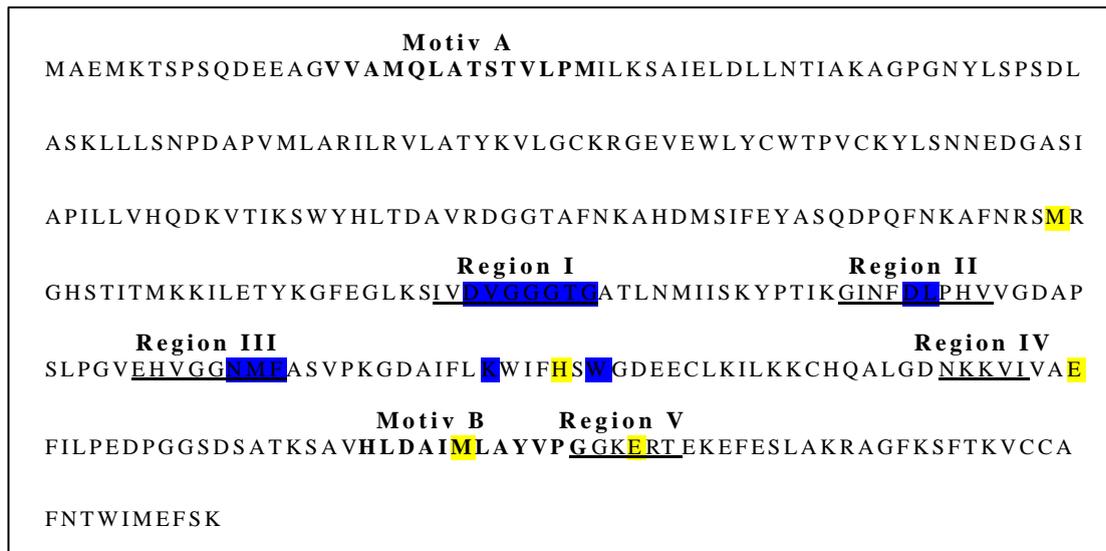


Abbildung 61: Konservierte Motive in der *A. majus* BMT

Die an der Substratbindung beteiligten Motive A und B sind fettgedruckt, an der SAM-Bindung beteiligte Aminosäuren blau und Aminosäuren mit katalytischer Funktion gelb unterlegt. Die fünf konservierten Sequenzmotive nach Ibrahim *et al.* (1998) sind unterstrichen.

Fünf hochkonservierte Regionen aus 36 AA-Resten befinden sich im letzten Drittel der Sequenzen. Die erste Region [IVDVGGGxG] ist glycinreich und befindet sich ungefähr 45 % vom C-Terminus entfernt. Ihr wird eine Beteiligung an der SAM-Bindung zugeschrieben (Ibrahim *et al.*, 1998). Die Regionen II [GINFFDLPHV] und III [EHVGGNMF] mit gleicher Funktion schließen im Abstand von ca. 10-15 Aminosäuren an Motiv I an. Es folgen noch Region IV [NKKVI], dessen Funktion noch nicht genau bekannt ist sowie die an der Substratorientierung zur Methylierung beteiligte Region V [GGKERT]. Die BMT zeigt 94,5 % Identität mit einer aus diesen Regionen aufgestellten Konsensus-Sequenz, dies entspricht 34 von 36 Aminosäuren. Für die BMT aus *P. crispum* (unveröffentlicht) konnte sogar 97 % Identität beschrieben werden (zitiert nach Ibrahim *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse wurden durch die Röntgenstrukturdaten pflanzlicher OMTn (Zubieta *et al.*, 2001; Zubieta *et al.*, 2002; Gang *et al.*, 2002) bekräftigt (**Abb. 61**) und erweitert. Die an der SAM-Bindung beteiligten Aminosäuren (blau unterlegt) decken sich bis auf einen Lysin- und Tryptophan-Rest mit den vorherigen Angaben. Durch zwei weitere hochkonservierte Methionine (gelb unterlegt) wird das aromatische Ringgerüst des Substrates so orientiert, dass es die zu methylierende Hydroxylgruppe dem SAM und der katalytischen Domäne der OMT präsentiert. Durch ein ebenfalls hochkonserviertes Histidin, eingerahmt von zwei Glutaminsäuren, erfolgt die Deprotonierung der Hydroxylgruppe (Zubieta *et al.*, 2001, 2002).

Die BMT zeigt zwei Abweichungen vom allgemeinen Schema: in dem zur Region III [EHVGGNMF] gehörenden Motiv DMF ist eine Asparaginsäure zu finden, die hier durch Asparagin ersetzt ist. Ein Einfluss auf die SAM-Bindung ist aufgrund ähnlicher Hydrophilie der Aminosäuren nicht zu erwarten. Der zweite Unterschied betrifft die Region IV [NKKVI] mit einem Austausch von Glycin gegen Lysin. Ob der Austausch gegen die stark basische Aminosäure einen Einfluss auf die Funktion des Enzyms hat, wurde im Rahmen der Arbeit nicht ermittelt. Durch Mutagenese-Studien kann dies untersucht werden.

Die Identität der Sequenz als BMT wurde durch Messung der katalytischen Aktivität des rekombinanten Enzyms festgestellt und Bergapten als Produkt der Umsetzung chromatographisch verifiziert.

Die rekombinante Expression der BMT bietet prinzipiell eine gute Voraussetzung für die präparative Reinigung des Enzyms. Allerdings zeigte bereits eine Fraktionierung über Fractogel, dass es sich um ein sehr labiles Enzym handelt. Das Einfrieren des Extraktes führte zu einer Verminderung der Aktivität auf nur noch 3 % im Vergleich zum Test, der direkt nach Fraktionierung erfolgte. Die Verwendung modifizierter Puffer und Veränderung der Parameter der SEC-Aufreinigung konnten das Enzym nicht stabilisieren. Weitere Reinigungsversuche über Anionenaustauscher (DEAE; MonoQ) und Affinitätschromatographie an SAM erbrachten keinen verbesserten Stabilisierungseffekt. Nach jeweils einem Reinigungsschritt konnte keine Aktivität mehr gemessen werden. Hauffe *et al.* (1986) konnten dagegen die native BMT und XMT aus *P. crispum* über Anionenaustausch- und SAH-Affinitätschromatographie, wenn auch unter hohem Aktivitätsverlust, trennen. Aus *R. graveolens* wurde bereits die Labilität der XMT beschrieben, die innerhalb weniger Tage bei -20°C -Lagerung fast 50 % ihrer Aktivität nach Entsalzung über Sephadex G-25 verlor. In diesem Falle blieb allerdings die BMT annähernd stabil (Thompson *et al.*, 1978). Die Labilität der rekombinanten BMT aus *A. majus* kann unter Umständen auf eine zu geringe Konzentration an stabilisierenden Begleitproteinen im Extrakt nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung zurückzuführen sein. Die Bakterienrohextrakte rekombinanter Enzyme enthalten weniger Begleitproteine als Rohextrakte nativer Enzyme aus pflanzlichen Zellen.

Eine vielversprechende Möglichkeit der Aufreinigung der BMT aus *A. majus* besteht über den in der pQE60-Vektorsequenz kodierten His-tag. Unter Ausschaltung des enzyemeigenen Stopkodons erfolgt die Expression des Enzyms unter Anhang von Histidinresten, die auf dem Vektor kodiert sind. Die Reinigung des Enzym-His-tag-Konstruktes wird über eine Nickelchelate-Chromatographie erreicht. Zum geringen Anteil können die komplexierten Metallionen des Säulenmaterials mit in den Enzymextrakt gelangen. Da Hemmungen der BMT-

Aktivität durch Ni^{2+} -Ionen (Thompson *et al.*, 1978) bekannt waren und somit die biochemische Charakterisierung stören würden, wurde auf diese Reinigungsmöglichkeit verzichtet.

Die biochemische Charakterisierung erfolgte daher aus dem entsalzten Rohextrakt nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung. Die Parameter, die für die *A. majus* BMT gemessen wurden, weichen nur geringfügig von den Daten der heterologen BMTn aus *P. crispum* und *R. graveolens* ab. Die BMT zeigt maximale Aktivität im Temperaturbereich von 35-44°C. Dieses breite Temperaturoptimum könnte als Anpassung des Enzyms an die Temperaturegebenheiten in der südeuropäischen und nordafrikanischen Heimat der Pflanze gewertet werden.

Das pH-Optimum der BMT liegt bei pH 8,0. *In vivo* liegt die BMT im Cytosol gelöst vor, welches im physiologischen Zustand einen pH von 7,0-7,5 aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass eine elicitor-vermittelte Induktion zu einer Ansäuerung (Hahlbrock *et al.*, 2003) des Cytosols und einer gleichzeitigen Alkalisierung des Außenmediums führt. Das leicht basische pH-Optimum der BMT würde eher auf Aktivität in leicht basischen Kompartimenten hinweisen. Da ein pH-Optimum nur experimentell bestimmt wird, hat es keine Aussagekraft darüber, bei welchen Bedingungen das Enzym *in situ* arbeitet. Daher ist es vorstellbar, dass die BMT *in situ* unter differierenden, evtl. suboptimalen pH-Bedingungen arbeitet.

Die fehlende Abhängigkeit der BMT-Reaktion von Mg^{2+} -Ionen bestätigt die bereits von anderen OMTn vorliegenden Daten (Ibrahim *et al.*, 1998; Zubieta *et al.*, 2001; Ibdah *et al.*, 2003). Eine Enzymhemmung konnte nur durch Co^{2+} -, Cu^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen gezeigt werden, wohingegen die BMT aus *R. graveolens* durch eine Vielzahl divalenter Ionen beeinflusst wird (Thompson *et al.*, 1978).

Die BMT besitzt eine hohe Spezifität für ihr Substrat Bergaptol. Bestimmungen der Michaelis-Menten-Konstanten ergaben 2,8 μM für Bergaptol und 6,7 μM für SAM. Vergleichbare Werte von 4,0 μM für Bergaptol und 3,1 μM für SAM zeigt die *P. crispum* BMT (Hauffe *et al.*, 1986). 5,8-Dihydroxypsoralen und 5-Hydroxyxanthotoxin wurden ebenfalls als Substrate aus derselben Pflanze und aus *R. graveolens* (Innocenti *et al.*, 1983) beschrieben. Diese Substrate sind kommerziell nicht verfügbar und müssen durch Spezialsynthese hergestellt werden. Ihre Testung dürfte ein wesentlicher Schritt zur Aufklärung des Methylierungsverlaufes der Psoralene in *A. majus* darstellen. Die Methylierung des 8-Hydroxybergaptens durch die BMT ist eher unwahrscheinlich und dürfte einer dritten hochspezifischen OMT zugeschrieben werden, da die XMTn aus *P. crispum* und *R. graveolens* nur Xanthotoxol umsetzten (Hauffe *et al.*, 1986; Thompson *et al.*, 1978; Sharma *et al.*, 1979).

Die BMT zeigt eine apparente Molekularmasse von 69,3 kDa. Dies spricht für das Vorliegen eines Dimers bei theoretischen Massen von 38,7 kDa (BMT-Monomer) und 77,4 kDa (BMT-Dimer). Das nicht eindeutige Ergebnis könnte durch eine verzögerte Elution der BMT wegen Wechselwirkungen mit der Gelmatrix verursacht worden sein. In diesem Fall würde die Verwendung anderer Materialien möglicherweise genauere Ergebnisse liefern. Beispielsweise könnten Versuche mit Sephadex (Pharmacia; Freiburg), das auf Dextranderivaten aufgebaut ist, durchgeführt werden. Eine Säulenchromatographie lässt lediglich eine Vermutung zu und muss letztlich z. B. mittels analytischer Ultrazentrifugation bestätigt werden. Diese Methode setzt aber das gereinigte Enzym voraus. Aufgrund der Labilität der BMT während der Aufreinigung konnte diese Methode daher nicht verwendet werden.

Da die Induzierbarkeit der Enzyme der Psoralenbiosynthese ein wichtiges Kriterium ist, wurde diese in einer Northern-Analyse untersucht. BMTn sind, wie die anderen Enzyme der Furanocumarinbiosynthese, durch Verwundung und pilzliche Elicitoren induzierbar, wobei die Induktion auf transkriptioneller Ebene gesteuert wird. Hierbei konnte eine deutliche Induzierbarkeit (Maximum nach 7 h) des Enzyms nach einer lag-Phase von etwa 2,5 h gezeigt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit weiteren bereits aus früheren Arbeiten des Arbeitskreises bekannten Daten aus Zellkulturen von *A. majus* (Tab. 15).

Tabelle 15: Induktion der Enzyme der Furanocumarinbiosynthese in *A. majus* und *P. crispum*

Enzym	Organismus	Transkript-maximum	Maximum der Enzymaktivität	Literatur
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL)	<i>A. majus</i>	---	8 h	Hamerski <i>et al.</i> , 1990b
Zimtsäure 4-Hydroxylase	<i>A. majus</i>	3,5 h	---	Hübner <i>et al.</i> , 2003
Prenyltransferasen	<i>A. majus</i>	5-6 h	8-14 h und 30 h	Hamerski <i>et al.</i> , 1990b
Marmesinsynthase	<i>A. majus</i>	---	12 h	Hamerski & Matern, 1988a
Psoralensynthase	<i>A. majus</i>	---	24 h	Hamerski & Matern, 1988a
Psoralen 5-Monooxygenase	<i>A. majus</i>	---	20-24 h	Hamerski & Matern, 1988b
Bergaptol <i>O</i> -Methyltransferase	<i>A. majus</i>	7 h	8-11 h	Hermann <i>et al.</i> , 2004
Bergaptol <i>O</i> -Methyltransferase	<i>P. crispum</i>	17,5 h	35 h	Hauffe <i>et al.</i> , 1986
Xanthotoxol <i>O</i> -Methyltransferase	<i>A. majus</i>	---	11 h	Ekiert & Lukacin ; vorliegende Arbeit
Xanthotoxol <i>O</i> -Methyltransferase	<i>P. crispum</i>	10 h	22 h	Hauffe <i>et al.</i> , 1986
Caffeoyl-CoA <i>O</i> -Methyltransferase	<i>A. majus</i>	3,5 h	8 h	vorliegende Arbeit
Caffeoyl-CoA <i>O</i> -Methyltransferase	<i>P. crispum</i>	6 h	10-15 h	Schmitt <i>et al.</i> , 1991

Auffällig ist der zwischen den Methyltransferasen auftretende Unterschied der Transkript- und Aktivitätsmaxima. Die OMTn aus *A. majus* zeigen gegenüber den entsprechenden Enzymen aus *P. crispum* Maximalwerte bereits nach der Hälfte der Zeit. Die CCoAOMT wurde als Vergleich herangezogen und zeigt in etwa den gleichen zeitlichen Unterschied. Die Transkript- und Enzymmaxima wurden jeweils aus Zellkultursystemen, also künstlichen Modellsystemen gemessen. Der Zustand der Kulturen und damit auch ihre Fähigkeit, Furanocumarine zu akkumulieren, ist abhängig vom Alter der Zellen, der Häufigkeit des Mediumwechsels, der Geschwindigkeit des Schüttlers oder auch von der Belichtung. Der Zustand der Kulturen mag daher ein möglicher Grund für die stark voneinander abweichenden Transkript- und Aktivitätsmaxima sein. Die Marmesin-Synthase, Psoralen-Synthase und Psoralen 5-Monooxygenase aus *A. majus* stellen frühere Enzyme im Verlauf der Biosynthese dar. Dennoch treten ihre Enzymmaxima viel später auf (12-24 h) als das der BMT (8-11 h). Dieser Unterschied kann ebenfalls auf den Zustand der Zellkulturen zurückzuführen sein.

E.5 Kaffeesäure *O*-Methyltransferase

Der generelle Phenylpropanweg ist nicht nur der Ausgangspunkt für die Furanocumarinbiosynthese, sondern auch für das pflanzliche Differenzierungsprogramm, die Ligninbiosynthese (Goujon *et al.*, 2003) (**Abb. 62**). Lignin ist eine wichtige Strukturkomponente der Zellwände höherer Pflanzen. Eine Verminderung oder strukturelle Veränderung des Ligningehaltes ist von großem Interesse für die Papierherstellung (Zhong *et al.*, 2000) und den Anbau leichter verdaubarer Futterpflanzen für die Viehzucht (Sewalt *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2001). Aufgrund seiner möglichen antimutagenen und anticancerogenen Wirkungen ist Lignin auch im Blickpunkt der medizinischen Forschung (Harris & Fergusson, 1999; Mikulášová & Košíková, 2003).

Nach derzeitigen Vorstellungen werden die Syringyl [S]-Einheiten des Lignins bevorzugt über Kaffeesäure *O*-Methyltransferase (COMT) katalysierte Methylierungsreaktionen gebildet, wobei nicht Kaffee- und 5-Hydroxyferulasäure, wie in älteren Modellen postuliert (Edwards & Dixon, 1991; Poeydomenge *et al.*, 1994; Meng & Campbell, 1996; Inoue *et al.*, 2000), sondern bevorzugt deren abgeleiteten Aldehyde und Alkohole methyliert werden (Osakabe *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Parvathi *et al.*, 2001; Zubieta *et al.*, 2002). Der genaue Biosyntheseweg zu den einzelnen Monolignolen ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt (Dixon *et al.*, 2001).

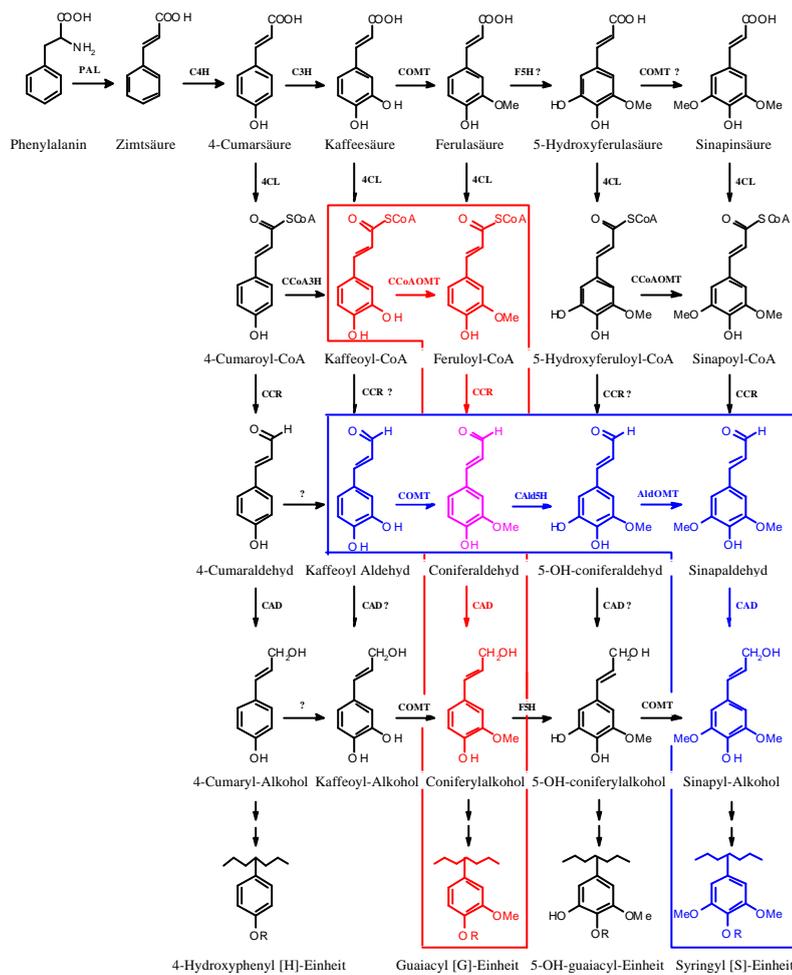


Abbildung 62:

Vorgeschlagener Biosyntheseweg der Monolignoleinheiten in Bedecktsamern (Dixon *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003)

Der vorgeschlagene Biosyntheseweg der Guaiacyl [G]-Einheiten ist rot, der der Syringyl [S]-Einheiten blau unterlegt. Die 5-Hydroxy-guaiacyl-Einheit spielt *in vivo* keine Rolle (Li *et al.*, 2000).

PAL: Phenylalanin Ammoniak-Lyase;
 C4H: Zimtsäure 4-Hydroxylase;
 C3H: Zimtsäure 3-Hydroxylase;
 COMT: Kaffeesäure *O*-Methyltransferase;
 F5H: Ferulasäure 5-Hydroxylase;
 CCoA3H: Cumaroyl-CoA 3-Hydroxylase;
 CCoAOMT: Kaffeoyle-CoA *O*-Methyltr.;
 CCR: Cinnamoyl-CoA Reduktase;
 CAld5H: Coniferylaldehyd 5-Hydroxylase (entspricht F5H, aber Umbenennung aufgrund Substratspezifität (Li *et al.*, 2000));
 AldOMT: 5-Hydroxyconiferylaldehyd *O*-Methyltransferase (entspricht COMT, aber Umbenennung aufgrund Substratspezifität (Li *et al.*, 2000));
 CAD: Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase

Datenbankanalysen der isolierten cDNA aus *A. majus*-Pflanzen zeigten eine auffällig hohe Homologie zu einer Vielzahl an COMTn, wobei die größte Ähnlichkeit zu einer COMT aus *Ocimum basilicum* (80 %) (Wang *et al.*, 1999) besteht. Die endgültige Verifizierung der Sequenz als COMT erfolgte nach Expression durch Messung der katalytischen Aktivität des rekombinanten Enzyms. Die Ferulasäure wurde als Produkt der Umsetzung chromatographisch bestätigt.

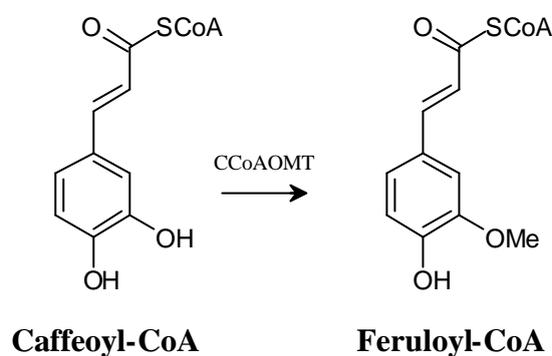
Die Parameter, die in der biochemischen Charakterisierung für die *A. majus* COMT gemessen wurden, weichen nur geringfügig von den Daten für heterologe COMTn ab. Im Gegensatz zur BMT ist die COMT nicht spezifisch für ein Substrat und setzt eine Vielzahl von Zimtsäure-Derivaten um (D.8.2.4; Tab. 14). Dies bestätigt die geringe Substratspezifität der COMTn *in vitro*. Sie wird verursacht durch eine im Vergleich zu hochspezifischen OMTn sehr geräumige Substrattasche mit nur geringen substratspezifischen van-der-Waals-Kräften (Zubieta *et al.*, 2002). Der überraschend hohe Umsatz des Kaffeesäuremethylesters deutet auf eine „stabile“ Einlagerung des im Vergleich zu den anderen Substraten etwas größeren

Moleküls in die Substrattasche hin. Damit verbunden scheint die stabile Präsentation der zu methylierenden Hydroxylgruppe zu sein. Wie von anderen COMTn bekannt (z. B. Bugos *et al.*, 1991; Edwards & Dixon, 1991; Gowri *et al.*, 1991; Meng & Campbell, 1996), setzt auch die *A. majus* COMT bevorzugt Substrate um, die an C₃ bereits methoxyliert sind und eine Hydroxylgruppe an C₅ (z.B. 5-Hydroxyferulasäure) besitzen. Der Umsatz mit 3-hydroxylierten Verbindungen (z.B. Kaffeesäure) ist geringer. Diese Präferenz dürfte unter Umständen auf eine stabilere Einlagerung des zweifach substituierten Benzolrings in die Bindetasche zurückzuführen sein. Die bevorzugte Methylierung der von der Kaffeesäure und 5-Hydroxyferulasäure abgeleiteten Aldehyde und Alkohole lässt sich ebenfalls durch eine stabilere Einbindung in die Substrattasche erklären. Hierbei dürften aber weniger sterische Effekte, sondern eher substratspezifische van-der-Waals-Kräfte eine Rolle spielen. Aufgrund der höheren Spezifität für den 5-Hydroxyconiferaldehyd wird die COMT auch bereits als 5-Hydroxyconiferaldehyd *O*-Methyltransferase (AldOMT) bezeichnet (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003). Die Aldehyde und Alkohole wurden als Substrate nicht getestet, eine höhere Spezifität diesen Verbindungen gegenüber ist aber auch für die *A. majus* COMT zu erwarten.

Aus der Literatur sind überwiegend COMTn bekannt, deren Hauptfunktion im Ligninstoffwechsel liegt. Diese Enzyme zeigen keine Induzierbarkeit. Es sind allerdings auch COMTn (COMT II) beschrieben, die geringe Aktivität in gesundem Pflanzengewebe zeigen, aber durch abiotische und biotische Elicitoren oder Infektion mit Pilzen oder Viren induzierbar sind (Gowri *et al.*, 1991; Pellegrini *et al.*, 1993). Die für die Induktion dieser COMT II auf transkriptioneller Ebene verantwortlichen *cis*-aktiven Sequenzelemente sind hochkonserviert in den Promotor-Regionen verschiedener Gene des Phenylpropanstoffwechsels wie der PAL, C4H, 4-Cl, CAD oder CCoAOMT (Toquin *et al.*, 2003). Dadurch wird die COMT II ebenfalls als typisches Enzym des elicitor-induzierbaren Phenylpropanweges klassifiziert und ihr Funktionen in der induzierten Abwehr der Pflanze durch Verstärkung der Zellwände zugeschrieben. Zur Überprüfung der Induzierbarkeit wurde die *A. majus* COMT in einer Northern-Analyse untersucht. Es wurde keine Induzierbarkeit festgestellt, was darauf hindeutet, dass die Hauptfunktion des Enzyms im Ligninstoffwechsel liegt.

E.6 Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferase

Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferasen (CCoAOMTn) sind durch Bildung lignin-ähnlicher Polymere zur Verstärkung der Zellwände (Kneusel *et al.*, 1989; Kühnl *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1991; Busam *et al.*, 1997) an der induzierten Abwehr der Pflanze beteiligt. Zudem werden die Guaiacyl [G]-Einheiten des Lignins in Bedeckt- und auch Nacktsamern (Anterola *et al.*, 2002) spezifisch über CCoAOMT katalysierte Methylierungsreaktionen mit einer *in vivo* Präferenz für Caffeoyl-CoA anstatt 5-Hydroxyferuloyl-CoA (Inoue *et al.*, 2000) gebildet.



CCoAOMTn unterscheiden sich grundlegend von allen bisher bekannten Klassen von OMTn. Beispielsweise beträgt die Länge ihrer Sequenz nur ungefähr 2/3 der Länge einer COMT. Im Gegensatz zu anderen pflanzlichen OMTn katalysieren sie die Methylierungen ihrer Substrate nur in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen. Datenbankvergleiche mit der hier aus *A. majus* isolierten CCoAOMT zeigten eine auffallend hohe Homologie zur CCoAOMT aus *P. crispum* mit 98,8 % Identität bei 99,6 % Ähnlichkeit. Diese beschränkt sich nicht nur auf die CCoAOMT, sondern wurde auch für die Zimtsäure 4-Hydroxylase (Hübner *et al.*, 2003) und eine Cytochrom P450 Reduktase (CPR) (Specker, 2004) beider Pflanzen gezeigt. Die zwei Spezies scheinen so nah verwandt zu sein, dass die Vermutung nahe liegt, dass ein enger evolutionärer Zusammenhang innerhalb der Familie der Apiaceae besteht. Weitere Untersuchungen bezüglich der Entwicklung einzelner Gattungen der Apiaceae sowie Sequenzvergleiche weiterer Enzyme (BMT, XMT, COMT) sind wünschenswert. Die CCoAOMTn aus *A. majus* und *P. crispum* unterscheiden sich nur in drei Aminosäuren und katalysieren die gleiche Reaktion. Dies ist nicht selbstverständlich, da für die untereinander sehr ähnlichen Chavicol und Eugenol *O*-Methyltransferase aus *Ocimum basilicum* gezeigt wurde, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure zur jeweils anderen Substratspezifität führen kann (Gang *et al.*, 2002). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden keine

Röntgenstrukturdaten veröffentlicht und keine konservierten Sequenzmotive beschrieben, die eine Zuordnung katalytischer Funktionen auf konservierte Aminosäuren und Aussagen über SAM-Bindemotive erlauben. Lediglich die Kristallstruktur einer Catechol-OMT der Ratte (Vidgren *et al.*, 1994) kann aufgrund der Gemeinsamkeiten in Molekulargewicht und Mg^{2+} -Abhängigkeit Anhaltspunkte zu SAM-Bindemotiven geben. Da ein Vergleich keine Aussagekraft besitzt, wurde die Sequenz der *A. majus* CCoAOMT diesbezüglich nicht weiter untersucht.

Die Identität des Enzyms als CCoAOMT wurde durch Messung der katalytischen Aktivität bestätigt und Feruloyl-CoA als Produkt der Umsetzung chromatographisch verifiziert. Die CCoAOMT steht zur Zeit im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen. In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse, ob die CCoAOMT aus *A. majus* neben den bereits beschriebenen Aufgaben auch potentielle Funktionen außerhalb des Ligninstoffwechsels wahrnimmt, wie es für CCoAOMTn aus *Mesembryanthemum crystallinum* (Ibdah *et al.*, 2003) und *Arabidopsis thaliana* beschrieben wurde. Diese Enzyme besitzen breitere Substratspezifitäten und setzen neben Caffeoyl-CoA auch eine Reihe von Flavonoiden um. Da sie sich in ihren Aminosäuresequenzen von den meisten CCoAOMTn unterscheiden, dürfte die *A. majus* CCoAOMT dieser Untergruppe von CCoAOMTn nicht zuzuordnen sein.

CCoAOMTn sind, wie bereits erwähnt, an der induzierten Abwehr der Pflanze beteiligt. Die Induktion wird auf transkriptioneller Ebene reguliert. In der Promotor-Region der CCoAOMT aus *P. crispum* konnte ein *cis*-aktives Element beschrieben werden, das an der Induktion mit *Pmg* beteiligt ist (Grimmig & Matern, 1997). Dieses Element ist hochkonserviert in den Genen der am induzierbaren Phenylpropanstoffwechsel beteiligten Enzyme. Dadurch lässt sich die CCoAOMT als typisches Enzym dieses Stoffwechselweges klassifizieren. Die Induzierbarkeit der *A. majus* CCoAOMT wurde in einer Northern-Analyse untersucht. Nach ca. 1 h stieg die Transkriptmenge stetig an und zeigte ein Maximum bei 3,5 h (**Tab. 16**).

Tabelle 16: Induktion der Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase verschiedener Spezies

Organismus	Transkriptmaximum	Maximum der Enzymaktivität	Literatur
<i>Ammi majus</i>	3,5 h	8 h	vorliegende Arbeit
<i>Ammi majus</i>	4 h	---	Schmitt <i>et al.</i> , 1991
<i>Petroselinum crispum</i>	6 h	10-15 h	Schmitt <i>et al.</i> , 1991; Grimmig <i>et al.</i> , 1999
<i>Vitis vinifera</i>	4 h	9 h	Busam <i>et al.</i> , 1997
<i>Nicotiana tabacum</i>	---	9 h	Maury <i>et al.</i> , 1999

Das Induktionsmuster deckt sich weitestgehend mit den Transkriptionsmaxima heterologer CCoAOMTn. Lediglich die *P. crispum* CCoAOMT erreicht die maximale Transkriptmenge erst nach 6 h bei maximaler Aktivität nach 10-15 h. Dieselbe zeitliche Verzögerung zeigte sich auch schon für die *A. majus* BMT und das entsprechende Enzym aus *P. crispum* (Hauffe *et al.*, 1986). Hieraus lässt sich schließen, dass das damals verwendete *P. crispum*-Zellkultursystem auf elicitor-vermittelte Induktion generell später reagierte als das in dieser Arbeit verwendete System. Dies könnte auch mit dem Zustand der Zellen zusammenhängen.

E.7 Kaffeesäure *O*-Methyltransferase-ähnliches Enzym

Auch die vierte Sequenz wurde mit verwandten Sequenzen in Datenbanken verglichen, um eine Zuordnung zu erreichen. Mit 44 % Identität hat die Sequenz die höchste Homologie zu zwei Catechol-OMTn aus *Thalictrum tuberosum* (Frick & Kutchan, 1999) und heterologen COMTn. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde das Enzym als COMT-ähnliches Protein (COMT2) betitelt.

Die Analyse der Sequenz ergab, dass sich die Übereinstimmungen hauptsächlich auf die für OMTn generell vorhandenen konservierten Sequenzmotive beziehen. Die Substratbindemotive unterscheiden sich in 15 von 26 Aminosäuren, was eine Umsetzung von Catechol, Kaffeesäure und Norcoclaurin, welche die Substrate der multifunktionellen Catechol OMTn aus *Thalictrum tuberosum* sind, eher unwahrscheinlich macht. Aber auch die an der Isoquinolinbiosynthese aus *Coptis japonica* beteiligten OMTn (Sato *et al.*, 1993, 1994; Morishige *et al.*, 2000, 2002) zeigen im Bereich der Substrattaschen nur geringe Homologie untereinander. Dennoch ist es fraglich, ob die COMT2 Umsetzungen von Alkaloiden katalysiert. Da weder Norcoclaurin noch andere Alkaloide der Berberin-Biosynthese in *A. majus* beschrieben worden sind und die Identität der COMT2 zu den entsprechenden Enzyme der Biosynthese relativ gering ist, wurden keine weiteren Untersuchungen hierzu durchgeführt.

Inkubationen erfolgten mit Cumarinen, Furanocumarinen, Zimtsäuren und Flavonoiden ohne jegliche Enzymaktivität. Eine XMT-Aktivität konnte ebenso nicht gemessen werden. Aufgrund des hohen Sequenzunterschieds der COMT2 zur BMT und der postulierten hohen Identität zwischen BMT und XMT wäre dies auch nicht zu erwarten. Eine weitere Möglichkeit stellen Substanzen dar, die an der Biosynthese flüchtiger Blütenduftstoffe beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist das Eugenol. Da eine (Iso)eugenol *O*-Methyltransferase

(IEMT) aus *Clarkia breweri* (Wang & Pichersky, 1999) 83 % Identität auf Aminosäureebene zu einer COMT derselben Pflanze zeigt, die Identität zwischen COMT und COMT2 aus *A. majus* dagegen unter 50 % liegt, ist diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich. Weitere Untersuchungen, die diese Vermutung bestätigen könnten, stehen noch aus.

Um weitere Informationen zu erhalten, wurde auch hier eine Northern-Analyse durchgeführt. Es ist bekannt, dass die an der Berberin-Biosynthese beteiligten Methyltransferasen in Zellkulturen mit Methyljasmonat induziert werden können und ein Maximum an mRNA-Transkript nach ca. 18 h erreicht wird (Frick & Kutchan, 1999). Im Falle der COMT2 konnte im Zeitraum von 0-8 h keine Induktion der relativen Transkriptmenge festgestellt werden.

E.6 Sequenzanalyse der Substratbindestellen

Die Substratspezifität der OMTn wird durch die katalytische Domäne im C-Terminus des einen Monomers und durch die N-terminale Domäne des symmetrisch arrangierten zweiten Monomers bestimmt. Diese bildet die Rückwand der Substratbindetasche aus. Die in die Tasche ragenden aromatischen und aliphatischen Seitenketten der Aminosäuren definieren durch van-der-Waals-Kräfte die Spezifitäten (Zubieta *et al.*, 2001, 2002). Die Kristallstrukturen der drei OMTn aus *Medicago sativa* haben erstmals die strukturellen Grundlagen der Substratspezifitäten innerhalb der großen OMT-Familie erkennen lassen.

Die Aminosäuresequenzen der BMT und COMT zeigen eine Identität von 64 % bei einem Ähnlichkeitsgrad von 78,4 %, wobei die Unterschiede in den Sequenzen über das gesamte Molekül verteilt sind. Dennoch besteht ein drastischer Unterschied in ihren Substratspezifitäten. Die möglichen Substratbindemotive lassen aber nur vier nichtkonservierte Austausche (**Abb. 63**) erkennen.

BMT-Amm	16	VVAMQLATSTVLP*	29	306	HLDAIMLAYVPG	317
COMT-Amm	23	MFAMQLASASVLP*	36	317	LIDVIMLAHNPG	328
		. ***** . . . *****			. * ***** . **	

Abbildung 63: Mögliche Substratbindestellen von BMT und COMT

Die grau unterlegten Aminosäuren bezeichnen die nichtkonservierten Austausche. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*), konservierte Austausche mit einem Punkt (.) gekennzeichnet.

Die vier divergierenden Aminosäuren sind Val-17/Phe-24, His-306/Leu-317, Ala-309/Val-320 und Val-315/Asn-326. Drei dieser Austausche sind Teil des Motivs im C-Terminus, das die Substrattasche bildet, während nur ein Austausch im N-Terminus, der die Rückwand der Bindetasche auskleidet, vorliegt. Die große Diskrepanz der Spezifität beider Enzyme dürfte durch die unterschiedlich in die Bindetasche hineinragenden Seitenketten der divergierenden Aminosäuren zu erklären sein. Sowohl durch sterische Effekte als auch durch spezifische vom Substrat abhängige van-der-Waals-Kräfte (Zubieta *et al.*, 2001) nehmen die Seitenketten Einfluss auf die zu akzeptierenden Substrate. Gezielte Mutationen dieser konservierten Austausche könnten zu stark erniedrigten oder auch veränderten Spezifitäten führen. Da auch Sequenzelemente außerhalb der zwei konservierten Sequenzmotive die Substratspezifität entscheidend mitbestimmen (Gang *et al.*, 2002), ist es unwahrscheinlich, dass nur die vier divergierenden Aminosäuren für den großen Unterschied in der Substratspezifität zwischen BMT und COMT verantwortlich sind. Für eine Chavicol und eine Eugenol *O*-Methyltransferase aus *Ocimum basilicum* (Gang *et al.*, 2002), die untereinander sehr ähnlich sind, wurde dennoch gezeigt, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure zur jeweils anderen Substratspezifität führen kann.

Um gezielte Aussagen auch für die BMT treffen zu können, bedarf es Röntgenstrukturdaten des Enzyms. Durch Mutationen weiterer an der Substratbindung beteiligter Aminosäuren könnten Aussagen getroffen werden, welche Aminosäuren den Unterschied in der Substratspezifität beider Enzyme bewirken.

E.9 Möglichkeiten zur Klonierung der XMT

Voruntersuchungen (Ekiert & Lukacin, unveröffentlicht; vorliegende Arbeit) hatten gezeigt, dass die XMT-Aktivität zwar sehr gut mit *Pmg*-Elicitor induzierbar ist, jedoch im Vergleich zur BMT niedrig bleibt (22-fache Steigerung der Ausgangsaktivität von 66 nkat/kg in 8 h Induktion gegenüber 6,7-facher Steigerung der BMT-Ausgangsaktivität von 407 nkat/kg). Neben der üblichen Kultivierung des *A. majus* L. Suspensionskulturmaterials (Hamerski, 1989; Hamerski *et al.*, 1990a) in B5⁺-Medium erfolgte die Zellanzucht in Linsmaier-Skoog-Medium nach Ekiert & Gomolka (2000). Diese Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass die Suspensionskultur durch Zusatz von 0,1 mg/l *a*-Naphthylelessigsäure (NAA) und 0,1 mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP) in vier Wochen bei 25 ± 2 °C und 900 Lux Belichtung im Vergleich zu Bergapten 10-fach mehr Xanthotoxin akkumuliert. Dies führte zu der Annahme, dass die Kulturen den Weg über Xanthotoxin zu Isopimpinellin nutzen (Ekiert & Gomolka, 2000), wohingegen frühere Arbeiten in anderen Medien Bergapten als Hauptmetaboliten beschreiben. Die auf diese Weise kultivierten Zellen wurden nach ein bis sechs Wochen geerntet, aufgeschlossen und die RNA isoliert. Die anschließende PCR mit degenerierten Primern lieferte jedoch wiederum nur ein für die BMT kodierendes Fragment (100 % Homologie auf Proteinebene). Aufgrund der zwischen der BMT und XMT vermuteten hohen Homologie ist dieses Ergebnis in dem für OMTn generell hoch konservierten Bereich zu erwarten gewesen.

Alternativ wurde auch versucht, mit BMT „*end-to-end*“-Primern bei niedrigen „*annealing*“-Temperaturen (45-56°C) XMT-Transkripte zu erfassen. Dieser Versuch führte ebenfalls nur zu BMT-Fragmenten (100 % Homologie auf Proteinebene). Es ist möglich, dass die Transkriptmenge der XMT im Vergleich zur BMT viel geringer ist, gleichzeitig aber eine sehr viel höhere Aktivität des translatierten Proteins aufweist.

Die bisher klonierten Enzyme aus *A. majus* (C4H (Hübner *et al.*, 2003); Cyt P450 Reduktase (Specker, 2004); CCoAOMT) weisen eine Homologie von 98,6% - 98,8% mit den diesbezüglichen Enzymen aus *P. crispum* (Koopmann *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 1991) auf. Vermutlich sind auch die OMTn der Furanocumarinbiosynthese in beiden Pflanzen sehr ähnlich. Zellkulturen von *P. crispum* L. zeigen eine im Vergleich zur BMT 10-fach erhöhte spezifische XMT-Aktivität (ca. 14 µkat/kg) (Hauffe *et al.*, 1986), die sich auch in der Transkriptionsmenge widerspiegeln könnte. In Vorversuchen wurde bereits die PCR-Amplifizierung von *P. crispum* cDNA-„*template*“ mit *A. majus*-BMT spezifischen Primern durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen konnten keine Banden detektiert werden.

Variationen der PCR-Parameter hinsichtlich der Zusammensetzung der Ansätze und anderer „annealing“-Bedingungen könnten das Ergebnis verbessern. Über die Sequenz der *P. crispum* XMT wäre dann die Isolierung der XMT aus *A. majus* mit XMT-spezifischen Primern denkbar. Eine Isolierung der BMT und XMT aus *R. graveolens* scheint weniger vielversprechend, da bereits Hauffe *et al.* (1986) aufgrund der signifikant unterschiedlichen Molekülmassen der BMT und XMT aus *P. crispum* (BMT: 73 kDa/XMT: 67 kDa) und *R. graveolens* (BMT: 85 kDa/XMT: 110 kDa) einen größeren Unterschied der Enzyme postulierten. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von XMT-cDNAn bietet die Isolierung aus Genbanken, die auch sehr seltene cDNAn erfasst.

E.10 Furanocumarine in Nutzpflanzen

Cyt P450 Enzyme, u.a. die humane CYP1A2, metabolisieren Procarcinogene wie heterozyklische Amine, Nitrosamine und die von Schimmelpilzen gebildeten Aflatoxine. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine Apiaceen-reiche Kost (Dill, Karotten, Petersilie, Sellerie) eine im Vergleich zur Apiaceen-freien Ernährung bis zu 25 % erniedrigte CYP1A2-Aktivität aufweist, die zu einem verminderten Abbau der Procarcinogene (Lampe *et al.*, 2000) führt und den Furanocumarinen zugeschrieben wurde.

Furanocumarine besitzen auch hohes phototoxisches Potential. Der Verzehr größerer Mengen furanocumarinhaltigen Gemüses, wie dem Sellerie, kann Erytheme hervorrufen (Ljunggren, 1990). Dies wird kontrovers diskutiert (Schlatter *et al.*, 1991; Gral *et al.*, 1993). Unbestritten sind die bei Erntearbeitern häufig auftretenden Kontaktdermatiden, die mit lokalen Rötungen, Schwellungen und Bläschenbildung (Finkelstein *et al.*, 1994) verbunden sind. Bei Floristen wurden furanocumarinhaltige Pflanzen als Auslöser einer Immunglobulin-vermittelten allergischen Rhinitis beschrieben (Kiistala *et al.*, 1999). Durch sauren Nebel in Ballungsgebieten steigt der Gehalt an Psoralenen in Sellerie um bis zu 540 % an (Coviella *et al.*, 2001). Sellerie zeigt eine bei Lagerung ansteigende Furanocumarinmenge (Aharoni *et al.*, 1996), die wie bei der Süßkartoffel (Afek & Orenstein, 2003) auf eine äußerst hohe Anfälligkeit gegenüber Pilzinfektionen zurückzuführen ist. Daher wurden resistenterer Varianten gezüchtet (Beier, 1990), die jedoch wiederum mit einem drastisch erhöhten Gehalt an Psoralenen verbunden sind.

Die Klonierung der BMT-cDNA könnte ein erster Schritt für die Züchtung furanocumarinfreier bzw. –armer Nutzpflanzen wie dem Sellerie bedeuten. Beispielsweise würde eine über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation der

BMT-Sequenz in *antisense*-Orientierung zur Hemmung der Genexpression und somit zur verminderten Bergapten-Bildung führen. Eine Unterbrechung der gesamten Furanocumarinbiosynthese müsste allerdings über ein im Biosyntheseweg früher ansetzendes Enzym wie die Psoralen-Synthase erfolgen. Dies würde bedeuten, dass Sellerie auch in Gebieten mit hoher Luftbelastung angebaut werden könnte. Da (+)-Marmesin stärker antimykotisch wirksam sein soll als Psoralen (Afek *et. al.*, 2002) und dessen Gehalt durch Blockade späterer Enzyme ansteigt, könnten die Pflanzen Pilzen gegenüber resistenter werden, ohne phototoxische Eigenschaften aufzuweisen.

F. Zusammenfassung

Furanocumarine besitzen vielfache biologische Aktivitäten und sind an der Ausprägung der induzierten Resistenz in Pflanzen aus den Familien der Apiaceae oder Rutaceae beteiligt. Darüber hinaus finden Furanocumarine aufgrund ihrer vielfältigen pharmakologischen Wirkungen u.a. Verwendung im Rahmen der PUVA-Therapie. Für weitere medizinische Anwendungsgebiete, u.a. der Multiplen Sklerose, sind sie in der Diskussion.

Die Biosynthese von Furanocumarinen aus Zimtsäure und Dimethylallylphosphat verläuft über eine Sequenz von Reaktionen, deren Abschluss die *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM)-abhängigen Bergaptol (BMT) und Xanthotoxol (XMT) *O*-Methyltransferasen bilden. Diese Enzyme katalysieren die Umsetzung von Bergaptol und Xanthotoxol zu den methylierten Produkten Bergapten und Xanthotoxin.

Mit moderner molekularbiologischer Methodik konnte eine BMT aus *Ammi majus* L. als erstes Enzym der Furanocumarinbiosynthese kloniert und heterolog exprimiert werden. Eine Sequenzhomologie der BMT zu Kaffeesäure *O*-Methyltransferasen (COMTn) war bereits früher postuliert worden (Ibrahim *et al.*, 1998). Diese Information wurde in der hier vorliegenden Arbeit genutzt, um aus *A. majus* sequenzverwandte OMTn zu klonieren. Eine der drei isolierten cDNAn konnte durch Expression in *E. coli* und nachfolgender biochemischer Charakterisierung als COMT verifiziert werden. Weiterhin gelang es, auch eine Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferase (CCoAOMT) aus *A. majus* zu klonieren.

Während COMT und CCoAOMT relativ breite Substratspezifität aufweisen, ist die BMT spezifisch für Bergaptol, wie die hohe Affinität zum Substrat ($K_m = 2,8 \mu\text{M}$) zeigt. Das Enzym liegt *in vivo* wahrscheinlich als Homodimer vor. Die BMT zeigt ein breites Temperaturoptimum von 35-44°C, das pH-Optimum liegt bei pH 8,0 und korreliert mit den für die nativen BMTn aus *P. crispum* und *R. graveolens* bekannten Werten. Die Aktivität der BMT ist von Mg^{2+} -Ionen unabhängig und konnte durch Co^{2+} -, Cu^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen gehemmt werden.

Die COMT besitzt eine geringe Substratspezifität und setzt neben Kaffeesäure und 5-Hydroxyferulasäure auch Caffeoyl-CoA, Daphnetin, Esculetin, Hydrokaffeesäure sowie einen Kaffeesäuremethylester um. Das Enzym liegt *in vivo* wahrscheinlich als Homodimer vor und zeigt maximale Aktivität bei pH 7,0. Das Temperaturoptimum wurde im Temperaturbereich von 28-35°C bestimmt. Die COMT-Reaktion ist ebenfalls Mg^{2+} -unabhängig, aber hemmbar mit einer Vielzahl weiterer Ionen.

Die CCoAOMT wurde in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert, da sie für die hier vorliegende Studie eher von geringerem Interesse war. Beachtenswert ist der außerordentlich hohe Grad der Identität von 98,8 % des Enzym aus *A. majus* zu der CCoAOMT aus *P. crispum* (99,6 % Ähnlichkeit). Die enge Verwandtschaft hatte sich auch bereits am Beispiel der Zimtsäure 4-Hydroxylasen und Cytochrom P450 Reduktasen beider Pflanzenspezies gezeigt, was eine ähnlich hohe Homologie auch zwischen den BMTn und COMTn beider Pflanzen vermuten lässt.

Die BMT und COMT wurden miteinander verglichen und eine hohe Ähnlichkeit von 78,4 % festgestellt. Alle für OMTn beschriebenen konservierten Sequenzmotive und katalytischen Aminosäuren mit Funktionen in der SAM-Bindung oder Substratpräsentierung sind in beiden Enzymen hochkonserviert. Die postulierten Substratbindestellen der BMT und COMT unterscheiden sich nur durch wenige nichtkonservierte Austausche.

Die Klonierung der BMT hat neben dem wissenschaftlichen Interesse auch praktischen Nutzen. Es hat sich gezeigt, dass durch Herbizide oder eine hohe Umweltbelastung die Konzentration an Psoralenen in Sellerie so stark ansteigt, dass beim Verzehr eine Dermatitis ausgelöst werden kann. Durch eine Regulation der Furanocumarinbiosynthese könnten psoralenfreie Varianten hergestellt und unbeachtet der Luftverschmutzung angebaut werden.

G. Literaturverzeichnis

- Abu-Mustafa, E.A., El-Bay, F.K.A. & Fayez, M.B.E.** (1975). Ammirin, a new coumarin constituent from *Ammi majus* L. fruits. *Naturwissenschaften* **72**, 39.
- Abu-Mustafa, E.A., El-Bay, F.K.A. & Fayez, M.B.E.** (1975). Alloimperatorin from *Ammi majus* L. fruits. *Naturwissenschaften* **72**, 40.
- Abu-Mustafa, E.A., El-Bay, F.K.A. & Fayez, M.B.E.** (1969). Natural coumarins XI. The distribution of coumarins in the *Ammi majus* L. plant and a possible pattern for their biogenetic evolution. *Planta Med.* **18**, 90-97.
- Afek, U. & Orenstein, J.** (2003). Decreased sweetpotato decay during storage by steam treatments. *Crop protect.* **22**, 321-324.
- Afek, U., Orenstein, J. & Aharoni, N.** (2002). The involvement of marmesin and its interaction with GA₃ and psoralens in parsley decay resistance. *Can. J. Plant Pathol.* **24**, 61-64.
- Aharoni, N., Afek, U., Finkelstein, E., Orenstein, J., Dvir, O., Nuriel, E. & Carmeli, S.** (1996). Impact of celery age and infection by *Botrytis cinerea* on linear furanocoumarin (psoralens) content in stored celery. *Phytoparasitica* **24**, 195-197.
- Akashi, T., Sawada, Y., Shimada, N., Sakurai, N., Aoki, T. & Ayabe, S.** (2003). cDNA cloning and biochemical characterization of *S*-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-*O*-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol.* **44**, 103-112.
- Allwood, E.G., Davies, D.R., Gerrish, C. & Bolwell, G.P.** (2002). Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean. *Plant Mol. Biol.* **49**, 533-544.
- Amthor, J.S.** (2003). Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Ann. Bot.* **91**, 673-695.
- Anterola, A.M., Jeon, J.-H., Davin, L.B. & Lewis, N.G.** (2002). Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. *J. Biol. Chem.* **277**, 18272-18280.
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M.-T., Monties, B., Fritig, B. & Legrand, M.** (1995). Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing *O*-methyltransferase sequence in sense and antisense orientation. *Plant J.* **8**, 465-477.
- Axelrod, J. & Weissbach, H.** (1960). Enzymatic *O*-methylation of *N*-acetylserotonin to melatonin. *Science* **131**, 1312.
- Baden, H.P., Parrington, J.M., Delhanty, J.D.A. & Pathak, M.A.** (1972). DNA synthesis in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts following treatment with 8-methoxypsoralen and long wave ultraviolet light. *Biochim. Biophys. Acta* **262**, 247-255.
- Bensadoun, A. & Weinstein, B.** (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 201-250.
- Bailey, J.A. & Mansfield, J.** (1982). Phytoalexins. Blackie, Glasgow.
- Bednarek, P., Kerhoas, L., Einhorn, J., Franski, R., Wojtaszek, P., Rybus-Zajac, M. & Stobiecki, M.** (2003). Profiling of flavonoid conjugates in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* responding to biotic and abiotic stimuli. *J. Chem. Ecol.* **29**, 1127-1142.
- Beier, R.C.** (1990). Natural pesticides and bioactive components in foods. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **113**, 47-137.

- Berenbaum, M.R.** (1981). Effects of linear furanocoumarins on an adapted specialist insect (*Papilio polyxenes*). *Ecol. Entomol.* **6**, 345-351.
- Berenbaum, M.R.** (2002). Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *J. Chem. Ecol.* **28**, 873-896.
- Bethea, D., Fullmer, B., Syed, S., Seltzer, G., Tiano, J., Rischko, C., Gillespie, L. & Brown, D.** (1999). Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J. Dermatol. Sci.* **19**, 78-88.
- Bohuslavizki, K.H., Hansel, W., Kneip, A., Koppenhofer, E., Niemoller, E. & Sanmann, K.** (1994). Mode of action of psoralens, benzofurans, acridinons, and coumarins on the ionic currents in intact myelinated nerve fibres and its significance in demyelinating diseases. *Gen. Physiol. Biophys.* **13**, 309-328.
- Bolwell, G.P., Bozak, K. & Zimmerlin, A.** (1994). Plant cytochrome P450. *Phytochem.* **37**, 1491-1506.
- Bordin, F., Marciani, S., Baccichetti, F., Dall'Acqua, F. & Rodighiero, G.** (1975). Studies on the photosensitizing properties of angelicin, an angular furocoumarin forming only monofunctional adducts with the pyrimidine bases of DNA. *Ital. J. Biochem.* **24**, 258-267.
- Bouwmeester, H.J., Kodde, J., Verstappen, F.W., Altug, I.G., de Kraker, J.W. & Wallaart, T.E.** (2002). Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiol.* **129**, 134-144.
- Brown, S.A.** (1960). Über die Lactonringbildung des Cumarins. *Z. Naturforsch.* **15B**, 768-769.
- Brown, S.A., el-Dakhkhny, M. & Steck, W.** (1970). Biosynthesis of linear furanocoumarins. *Can. J. Biochem.* **48**, 863-871.
- Brown, S.A. & Sampathkumar, S.** (1977). The biosynthesis of isopimpinellin. *Can. J. Biochem.* **55**, 686-692.
- Bugos, R.C., Chiang, V.L. & Campbell, W.H.** (1991). cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase of aspen. *Plant. Mol. Biol.* **17**, 1203-1215.
- Busam, G., Grimmig, B., Kneusel, R.E. & Matern, U.** (1997). Isolation of tobacco cDNAs encoding caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase. Plant Gene Register PGR97-039 (Z82982 / Z56282).
- Busam G., Junghanns, K.T., Kneusel R.E., Kassemeyer H.H. & Matern U.** (1997). Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol.* **115**, 1039-1048.
- Cacace, S., Schröder, G., Wehinger, E., Strack, D., Schmidt, J. & Schröder, J.** (2003). A flavonol *O*-methyltransferase from *Catharantus roseus* performing two sequential methylations. *Phytochem.* **62**, 127-137.
- Campa, C., Legal, L., Khounlotham, M., Noirot, M. & de Kochko, A.** (2001). Complete cDNA sequence of a caffeic acid *O*-methyltransferase from *Coffea canephora* fruit. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases (AT454632).
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T. & Hirt, H.** (2000). Differential activation of four specific MAOK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.* **275**, 36734-36740.
- Cassier, C., Chanet, R. & Moustacchi, E.** (1984). Mutagenic and recombinagenic effects of DNA cross-links induced in yeast by 8-methoxypsoralen photoaddition. *Photochem. Photobiol.* **39**, 799-803.
- Chapple, C.** (1998). Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 311-343.

- Chen, J.-S., Berenbaum, M.R. & Schuler, M.A.** (2002). Amino acids in SRS1 and SRS6 are critical for furanocoumarin metabolism by CYP6B1v1, a cytochrome P450 monooxygenase. *Insect Mol. Biol.* **11**, 175-186.
- Civardi, L., Rigau, J. & Puigdomenech, P.** (1999). Nucleotide sequence of two cDNAs coding for caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase (CCoAOMT) and study of their expression in *Zea mays*. Plant Gene Register PGR99-113 (AJ242980).
- Cock, J.M., Scalliet, G. & Hugueney, P.** (2002). Characterisation of a novel *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxybenzene, two major scent components of rose flowers. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases (AJ439740).
- Cohen, M.B., Schuler, M.A. & Berenbaum, M.R.** (1992). A host-inducible P450 from a host-specific caterpillar: Molecular cloning and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10920-10924.
- Cole, R.S.** (1971). Psoralen monoadducts and interstrand cross-links in DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **254**, 30-39.
- Coviella, C., Stipanovic, R.D. & Trumble, J.T.** (2001). Plant allocation to defensive compounds in elevated atmospheric CO₂ and mechanism of plant resistance to herbivorous insects. *Experiment. Bot.* **53**, 323-331.
- Curry, J., Mendoza, M. & O'Connell, M.** (1998). Nucleotide sequence of a caffeic acid 3-*O*-methyltransferase gene from Habanero Chile. Plant Gene Register PGR98-170 (AF081214).
- Dakora, F.D. & Phillips, D.A.** (1996). Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend antimicrobial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Path.* **49**, 1-20.
- Dall'Acqua, F., Marciani Magno, S., Zambon, F. & Rodighiero, G.** (1979). Kinetic analysis of the photoreaction (365 nm) between psoralen and DNA. *Photochem. Photobiol.* **29**, 489-495.
- De Melis, L.E., Whiteman, P.H. & Stevenson, T.W.** (1999). Molecular cloning, expression and substrate specificity of two caffeoyl-CoA *O*-methyltransferases from *Eucalyptus globulus*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases (AF168780).
- Dercks, W., Trumble, J. & Winter, C.** (1990). Impact of atmospheric pollution alters linear furanocoumarin content in celery. *J. Chem. Ecol.* **16**, 443-454.
- Dhillon, D.S. & Brown, S.A.** (1976). Localization, purification, and characterization of dimethylallylpyrophosphate:umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Arch. Biochem. Biophys.* **177**, 74-83.
- Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D. & Parvathi, K.** (2001). The biosynthesis of monolignols : a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacacyl and syringyl units? *Phytochem.* **57**, 1069-1084.
- Dollahite, J.W., Younger, R.L. & Hoffmann, G.O.** (1978). Photosensitization in cattle and sheep caused by feeding *Ammi majus* (greater Ammi; Bishop's -Weed). *Am. J. Vet. Res.* **39**, 193-197.
- Dumas, B., Van Doorselaere, J., Gielen, J., Legrand, M., Fritig, B., Van Montagu, M. & Inzé, D.** (1992). Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding *O*-methyltransferase from poplar. *Plant Physiol.* **98**, 796-797.
- During, T., Gerst, F., Hansel, W., Wulff, H. & Koppenhofer, E.** (2000). Effects of three alkoxy-psoralens on voltage gated ion channels in Ranvier nodes. *Gen. Physiol. Biophys.* **19**, 345-364.
- Ebel, J., Hahlbrock, K. & Grisebach, H.** (1972). Purification and properties of *o*-dihydric phenol *m*-*O*-methyltransferase from cell suspension cultures of parsley in relation to flavonoid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **269**, 313-326.

- Ebel, J., Schmidt, W.E. & Loyal, R.** (1984). Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **232**, 240-248.
- Eckey-Kaltenbach, H., Ernst, D., Heller, W. & Sandermann Jr., H.** (1994). Biochemical plant responses to ozone. IV. cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants. *Plant Physiol.* **104**, 67-74.
- Edwards, R. & Dixon, R.A.** (1991). Purification and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-*O*-methyltransferase from suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **287**, 372-379.
- Edwards, K.G. & Stoker, J.R.** (1967). Biosynthesis of coumarin: the isomerization stage. *Phytochem.* **6**, 655-661.
- Egyed, M.N., Shlosberg, A., Eilat, A., Cohen, U. & Beemer, A.** (1974). Photosensitization in dairy cattle associated with the ingestion of *Ammi majus*. *Refu. Vet.* **31**, 128-131.
- Eichman, B.F., Mooers, B.H.M., Alberti, M., Hearst, J.E. & Ho, P.S.** (2001). The crystal structures of psoralen cross-linked DNAs: drug-dependent formation of holliday junctions. *J. Mol. Biol.* **308**, 15-26.
- Ekiert, H. & Gomólka, E.** (2000). Coumarin compounds in *Ammi majus* L. callus cultures. *Pharmazie* **55**, 684-687.
- Elgamal, M.H.A., Shalaby, N.M.M., Duddeck, H. & Hiegemann, M.** (1993). Coumarins and coumarin glucosides from the fruits of *Ammi majus*. *Phytochem.* **34**, 819-823.
- El Mofty, A.M.** (1948). A preliminary clinical report on the treatment of leucoderma with *Ammi majus* Linn. *J. Roy. Egyptian MA* **31**, 651-665.
- El Mofty, M., Zaher, H., Esmat, S., Youssef, R., Shahin, Z., Bassioni, D. & El Enani, G.** (2001). PUVA and PUVB in vitiligo – are they equally effective? *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **17**, 159-163.
- Fahmy, I.R. & Abu-Shady, H.** (1948). Isolation and properties of ammoidin and majudin and their effect in treatment of leucoderma. *Q. J. Pharm. Pharmacol.* **21**, 499.
- Finkelstein, A., Afek, U., Gross, E., Aharoni, N., Rosenberg, L. & Halevy, S.** (1994). An outbreak of phytophotodermatitis due to celery. *Int. J. Dermatol.* **33**, 116-118.
- Franke, K., Porzel, A., Masaoud, M., Adam, G. & Schmidt, J.** (2001). Furanocoumarins from *Dorstenia gigas*. *Phytochem.* **56**, 611-621.
- Frick, S. & Kutchan, T.M.** (1999). Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.* **17**, 329-339.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. & Martin, G.R.** (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene specific oligonucleotide primer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.
- Fulton, D.C., Kroon, P.A., Matern, U., Threlfall, D.R. & Whitehead, I.M.** (1993). Inhibition of phytosterol biosynthesis in elicitor-treated cultures of *Ammi majus*. *Phytochem.* **34**, 139-145.
- Gang, D.R., Lavid, N., Zubieta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Noel, J.P. & Pichersky, E.** (2002). Characterization of phenylpropene *O*-methyltransferases from sweet basil: Facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant *O*-methyltransferase family. *Plant Cell* **14**, 505-519.
- Garcia-Mas, J., Messeguer, R., Arus, P. & Puigdomenech, P.** (1995). The caffeic acid *O*-methyltransferase from *Prunus amygdalus*. Plant Gene Register PGR95-006 (X83217).

- Gauthier, A., Gulick, P.J. & Ibrahim, R.K. (1996). cDNA cloning and characterization of a 3'/5'-*O*-methyltransferase for partially methylated flavonols from *Chrysosplenium americanum*. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1163-1169.
- Gauthier, A., Gulick, P.J. & Ibrahim, R.K. (1998). Characterization of two cDNA clones which encode *O*-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 243-249.
- Gestetner, B. & Conn, E.E. (1974). The 2-hydroxylation of *trans*-cinnamic acid by chloroplasts from *Melilotus alba* desr. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 617-624.
- Giuliano, G., Bartley, G.E. & Scolino P.A. (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* **5**, 379-387.
- Golub, E.I. (1988). 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1641.
- Goujon, T., Sibout, R., Eudes, A., MacKay, J. & Jouanin, L. (2003). Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem.* **41**, 677-687.
- Gowri, G., Bugos, R.C., Campbell, W.H., Maxwell, C.A. & Dixon, R.A. (1991). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L). X. Molecular cloning and expression of *S*-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, a key enzyme of lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* **97**, 7-14.
- Grab, D., Loyal, R. & Ebel, J. (1985). Elicitor-induced phytoalexin synthesis in soybean cells: changes in the activity of chalcone synthase mRNA and the total population of translatable mRNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 523-529.
- Gral, N., Beani, J.C., Bonnot, D., Mariotte, A.M., Reymond, J.L. & Amblard, P. (1993). Plasma levels of psoralens after celery ingestion. *Ann. Dermatol Venerol.* **120**, 599-603.
- Green, E.S., Zangerl, A.R. & Berenbaum, M.R. (2001). Effects of phytic acid and xanthotoxin on growth and detoxification in caterpillars. *J. Chem. Ecol.* **27**, 1763-1773.
- Grimmig, B., Kneusel, R.E., Junghanns, K.T. & Matern, U. (1999). Expression of bifunctional caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase in stress compensation and lignification. *Plant Biol.* **1**, 299-310.
- Grimmig, B. & Matern, U. (1997). Structure of the parsley caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive *cis*-acting element. *Plant Mol. Biol.* **33**, 323-341.
- Grisebach, H. & Ollis, W.D. (1961). Biogenetic relationship between coumarins, flavonoids, isoflavonoids, and retinoids. *Experientia* **17**, 4-12.
- Gryciuk, A.A. & Tsuyumu, S. (1999). Cloning of a genomic DNA encoding caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase of citrus. Submitted to the EMBL/GenBank/DBJ databases (AB035144).
- Guo, D., Chen, F., Wheeler, J., Winder, J., Selman, S., Peterson, M. & Dixon, R.A. (2001). Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin *O*-methyltransferases. *Transgenic Res.* **10**, 457-464.
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K. & Schmelzer, E. (1998). Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8398-8403.
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nürnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I.E. & Tan, J. (2003). Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14569-14576.
- Hahlbrock, K., Lamb, C.J., Purwin, C., Ebel, J., Fautz, E. & Schäfer, E. (1981). Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Induction of the enzymes of general phenylpropanoid metabolism. *Plant Physiol.* **67**, 768-773.

- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R. & Schmelzer, E.** (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4150-4157.
- Halkier, B.A.** (1996). Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochem.* **43**, 1-21.
- Hamerski, D.** (1989). *Ammi majus* L. Zellsuspensionskulturen al Modellsystem zum Studium der Coumarin-Biosynthese. Dissertation, Universität Freiburg.
- Hamerski, D., Beier, R.C., Kneusel, R.E., Matern, U. & Himmelspach, K.** (1990a). Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension cultures of *Ammi majus*. *Phytochem.* **29**, 1137-1142.
- Hamerski, D. & Matern, U.** (1988a). Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in *Ammi majus* L. suspension cultures. Microsomal conversion of demethylsuberosin into (+)-marmesin and psoralen. *Eur. J. Biochem.* **171**, 369-375.
- Hamerski, D. & Matern, U.** (1988b). Biosynthesis of psoralens. Psoralen 5-monooxygenase activity from elicitor-treated *Ammi majus* cells. *FEBS* **239**, 263-265.
- Hamerski, D., Schmitt, D. & Matern, U.** (1990b). Induction of two prenyltransferases for the accumulation of coumarin phytoalexins in elicitor-treated *Ammi majus* cell suspension cultures. *Phytochem.* **29**, 1131-1135.
- Hanawa, F., Yamada, T. & Nakashima, T.** (2001). Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochem.* **57**, 223-228.
- Hann, S.K., Cho M.Y., Im, S. & Park, Y.K.** (1991). Treatment of vitiligo with oral 5-methoxypsoralen. *J. Dermatol.* **18**, 324-329.
- Harris, P.J. & Fergusson, L.R.** (1999). Dietary fibers may protect or enhance carcinogenesis. *Mut. Res.* **443**, 95-110.
- Harrison, T.L., Zangerl, A.R., Schuler, M.A. & Berenbaum, M.R.** (2001). Developmental variation in cytochrome P450 expression in *Papilio polyxenes* in response to xanthotoxin, a hostplant allelochemical. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **48**, 179-189.
- Hauffe, K.D.** (1988). Induktion von O-Methyltransferasen der Furanocoumarinbiosynthese in *Petroselinum crispum* L. Dissertation, Universität Köln.
- Hauffe, K.D., Hahlbrock, K. & Scheel, D.** (1986). Elicitor-stimulated furanocoumarin biosynthesis in cultured parsley cells: s-adenosyl-L-methionine:bergaptol and s-adenosyl-L-methionine:xanthotoxol O-methyltransferases. *Z. Naturforsch.* **41c**, 228-239.
- Hehmann, M., Lukacin, R., Ekiert, H. & Matern, U.** (2004). Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L. Cloning of bergaptol O-methyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **271**, 932-940.
- He, K., Iyer, K.R., Hayes, R.N., Sinz, M.W., Woolf, T.F. & Hollenberg, P.F.** (1998). Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 252-259.
- He, X.-Z. & Dixon, R.A.** (1996). Affinity chromatography, substrate/product specificity, and amino acid sequence analysis of an isoflavone O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **336**, 121-129.
- Hoffmann, L., Maury, S., Bergdoll, M., Thion, L., Erard, M. & Legrand, M.** (2001). Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **39**, 36831-36838.
- Honigsmann, H., Jaschke, E., Gschnait, F., Brenner, W., Fritsch, P. & Wolff, K.** (1979). 5-methoxypsoralen (bergapten) in photochemotherapy of psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **101**, 369-378.

- Ho, P.C., Saville, D.J., Coville, P.F. & Wanwimolruk, S. (2000). Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products. *Pharm. Acta. Helv.* **74**, 379-385.
- Huang, H.C., Lai, M.W., Wang, H.R., Chung, Y.L., Hsieh, L.M. & Chen, C.C. (1993). Antiproliferative effect of esculetin on vascular smooth muscle cells: possible roles of signal transduction pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **237**, 39-44.
- Hübner, S., Hehmann, M., Schreiner, S., Martens, S., Lukacin, R. & Matern, U. (2003). Functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from *Ammi majus* L. *Phytochemistry* **64**(2), 445-452.
- Ibdah, M., Zhang, X.H., Schmidt, J. & Vogt, T. (2003). A novel Mg²⁺-dependent *O*-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Biol. Chem.* **278**, 43961-43972.
- Ibrahim, R.K. (1997). Plant *O*-methyltransferase signatures. *Trends Plant Sci.* **2**, 249-250.
- Ibrahim, R.K., Bruneau, A. & Bantignies, B. (1998). Plant *O*-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Mol. Biol.* **36**, 1-10.
- Ibrahim, R.K., De Luca, V., Latchinian, L., Brisson, L. & Charest, P.M. (1987). Enzymology and compartmentation of polymethylated flavonol glucosides in *Chrysosplenium americanum*. *Phytochem.* **26**, 1237-1245.
- Ichimura, M., Furuno, T., Takahashi, T., Dixon, R.A. & Ayabe, S. (1997). Enzymatic *O*-methylation of isoliquiritigenin and licodione in alfalfa and licorice cultures. *Phytochem.* **44**, 991-995.
- Innocenti, G., Dall'Acqua, F. & Caporale, G. (1983). The role of 5,8-dihydroxypsoralen in the biosynthesis of isopimpinellin. *Phytochem.* **22**, 2207-2209.
- Inoue, K., Parvathi, K. & Dixon, R.A. (2000). Substrate preferences of caffeic acid 3/5-*O*-methyltransferases in developing stems of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 175-182.
- Inoue, K., Sewalt, V.J.H., Ballance, G.M., Ni, W., Sturzer, C. & 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 Physiol.* **117**, 761-770.
- Isaacs, S.T., Shen, C.-K. J., Hearst, J.E. & Rapoport, H. (1977). Synthesis and characterization of new psoralen derivatives with superior photoreactivity with DNA and RNA. *Biochemistry*, **16**, 1058-1064.
- Ivie, G.W. (1978). Linear furocoumarins (psoralens) from the seed of Texas *Ammi majus* L. (Bishop's Weed). *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1394-1403.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4800-4805.
- Jonsson, L.M., Aarsman, M., Schram, A.W. & Bennink, G.J. (1982). Methylation of anthocyanins by cell-free extracts of *Petunia hybrida*. *Phytochem.* **21**, 2457-2459.
- Jordan, J., Lipp, A., Tank, J., Schröder, C., Stoffels, M., Franke, G., Diedrich, A., Arnold, G., Goldstein, D.S., Sharma, A.M., Luft, F.C. (2002). Catechol-*O*-methyltransferase and blood pressure in humans. *Circulation* **106**, 460-465.
- Joshi, C.P. & Chiang, V.L. (1998). Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-*L*-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **37**, 663-674
- Kagan, R.M. & Clarke, S. (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 417-427.

- Kauss, H., Franke, R., Krause, K., Conrath, U., Jeblick, W., Grimmig, B. & Matern, U.** (1993). Conditioning of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cells increases elicitor-induced incorporation of cell wall phenolics. *Plant Physiol.* **102**, 459-466.
- Khouri, H.E., Tahara, S. & Ibrahim, R.K.** (1988). Partial purification, characterization, and kinetic analysis of isoflavone 5-*O*-methyltransferase from yellow lupin roots. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 592-598.
- Kiistala, R., Mäkinen-Kiljunen, S., Heikkinen, K., Rinne, J. & Hahtela, T.** (1999). Occupational allergic rhinitis and contact urticaria caused by bishop's weed (*Ammi majus*). *Allergy* **54**, 635-639.
- Kindl, H.** (1971). Zur Frage der ortho-Hydroxylierung aromatischer Carbonsäuren in höheren Pflanzen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 78-84.
- Kitamura, Y., Ohta, M., Ikenaga, T. & Watanabe, M.** (2002). Responses of anthocyanin-producing and non-producing cells of *Glehnia littoralis* to radical generators. *Phytochem.* **59**, 63-68.
- Kneusel, R.E., Matern, U. & Nicolay, K.** (1989). Formation of trans-caffeoyl CoA from trans-4-coumaroyl CoA by Zn²⁺-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Arch Biochem Biophys* **269**: 455-462.
- Koenigs, L.L. & Trager, W.F.** (1998). Mechanism-based inactivation of P450 2A6 by furanocoumarins. *Biochem.* **37**, 10047-10061.
- Koopmann, E., Logemann, E. & Hahlbrock, K.** (1999). Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. *Plant Physiol.* **119**, 49-55.
- Królicka, A., Staniszewska, I., Bielawski, K., Malinski, E., Szafranek, J. Lojkowska, E.** (2001). Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Science* **160**, 259-264.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. & Scheel, D.** (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.* **278**, 2256-2264.
- Kühnl, T., Koch, U., Heller, W. & Wellmann, E.** (1989). Elicitor induced *S*-adenosyl-L-methionine:caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase from carrot cell suspension cultures. *Plant Sci.* **60**, 21-25.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684.
- Lamb, C. & Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- Lampe, J.W., King, I.B., Li, S., Grate, M.T., Barale, K.V., Chen, C., Feng, Z. & Potter, J.D.** (2000). Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinog.* **21**, 1157-1162.
- Lavid, N., Wang, J., Shalit, M., Guterman, I., Bar, E., Beuerle, T., Menda, N., Shafir, S., Zamir, D., Adam, Z., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E. & Lewinsohn, E.** (2002). *O*-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol.* **129**, 1899-1907.
- Lee, B.-H., Choi, D. & Lee, K.-W.** (1998). Isolation and characterization of *o*-diphenol-*O*-methyltransferase cDNA clone in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant Biol.* **41**, 9-14.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. & Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**, 2054-2057.
- Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T. & Chiang, V.L.** (2000). 5-Hydroxy-coniferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J. Biol. Chem.* **275**, 6537-6545.

- Li, L., Osakabe, Y., Joshi, C.P. & Chiang, V.L.** (1999). Secondary xylem-specific expression of caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase plays an important role in the methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Plant. Mol. Biol.* **40**, 555-565.
- Li, L., Zhou, Y., Cheng, X., Sun, J., Marita, J.M., Ralph, J. & Chiang, V.L.** (2003). Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4939-4944.
- Li, X., Berenbaum, M.R. & Schuler, M.A.** (2000). Molecular cloning and expression of CYP6B8: a xanthotoxin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 75-84.
- Logemann, E., Parniske, M. & Hahlbrock, K.** (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5905-5909.
- Lohman, D.J. & McConnaughay, K.D.** (1998). Pattern of defensive chemical production in wild parsnip seedlings (Apiaceae: *Pastinaca sativa*). *Chemoecology* **8**, 195-200.
- Lowry, O.H., Roesbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.** (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* **193**, 265-275.
- Lozoya, E., Block, A., Lois, R., Hahlbrock, K. & Scheel, D.** (1991). Transcriptional repression of light-induced flavonoid synthesis by elicitor treatment of cultured parsley cells. *Plant J.* **1**, 227-234.
- Ljunggren, B.** (1990). Severe phototoxic burn following celery ingestion. *Arch. Dermatol.* **126**, 1334-1336.
- Maenpaa, J., Juvonen, R., Raunio, H., Rautio, A. & Pelkonen, O.** (1994). Metabolic interactions of methoxsalen and coumarin in humans and mice. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1363-1369.
- Ma, R., Cohen, M.B., Berenbaum, M.R. & Schuler, M.A.** (1994). Black swallowtail (*Papilio polyxenes*) alleles encode cytochrome P450s that selectively metabolize linear furanocoumarins. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 332-340.
- Martz F., Maury S., Pincon G. & Legrand M.** (1998). cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. *Plant Mol. Biol.* **36**, 427-437.
- Matern, U.** (1991). Coumarins and other phenylpropanoid compounds in the defense response of plant cells. *Planta Med.* **57**, 15-20.
- Matern, U., Lüer, P. & Kreuzsch, D.** (1999). Biosynthesis of coumarins. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry. Vol. 1: Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives* (Sankawa, U., ed.). 623-637. Pergamon, Oxford.
- Matern, U., Wendorff, H., Hamerski, D., Pakusch, A.E. & Kneusel, R.E.** (1988). Elicitor-induced phenylpropanoid synthesis in Apiaceae cell culture. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* **14**, 173-184.
- Maury, S., Geoffrey, P. & Legrand, M.** (1999). Tobacco *O*-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-*O*-methyltransferase and caffeic acid / 5-hydroxyferulic acid 3/5-*O*-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiol.* **121**, 215-223.
- Maxwell, C.A., Edwards, R. & Dixon, R.A.** (1992). Identification, purification and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine: isoliquiritigenin 2'-*O*-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 156-166.
- McNeely, W. & Goa, K.L.** (1998). 5-Methoxypsoralen. A review of its effects in psoriasis and vitiligo. *Drugs.* **56**, 667-690.

- Meng, H. & Campbell, W.H.** (1996). Characterization and site-directed mutagenesis of aspen lignin-specific *O*-methyltransferase expressed in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 329-341.
- Meyermans, H., Morreel, K., Lapierre, C., Pollet, B., De Bruyn, A., Busson, R., Herdewijn, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Marita, J.M., Ralph, J., Chen, C., Van Montagu, M., Messens, E. & Boerjan, W.** (2000). Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 36899-36909.
- Michalowski, C.B. & Bohnert, H.J.** (1998). Caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase from *Mesembryanthemum crystallinum*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases (AF053553)
- Mikulášová, M. & Košíková, B.** (2003). Modulation of mutagenicity of various mutagens by lignin derivatives. *Mut. Res.* **535**, 171-180.
- Milesi, S., Massot, B., Gontier, E., Bourgaud, F. & Guckert, A.** (2001). *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Science* **161**, 189-199.
- Mizuno, A., Takata, M., Okada, Y., Okuyama, T., Nishino, H., Nishino, A., Takayasu, J. & Iwashima, A.** (1994). Structures of new coumarins and antitumor-promoting activity of coumarins from *Angelica edulis*. *Planta Med.* **60**, 333-336.
- Mohri, K., Uesawa, Y. & Sagawa, K.-I.** (2000). Effects of long-term grapefruit juice ingestion on nifedipine pharmacokinetics: induction of rat hepatic P-450 by grapefruit juice. *Drug Metab. Disp.* **28**, 482-486.
- Morishige, T., Dubouzet, E., Choi, K.-B., Yazaki, K. & Sato, F.** (2002). Molecular cloning of columbamine *O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5659-5667.
- Morishige, T., Tsujita, T., Yamada, Y. & Sato, F.** (2000). Molecular characterization of the *S*-adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine 4'-*O*-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **275**, 23398-23405.
- Murray, R.D.H., Méndez, J. & Brown, S.A.** (1982). The Natural Coumarins. Occurrence, chemistry and biochemistry. Wiley, New York.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. & Scheel, D.** (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449-460.
- Osakabe, K., Tsao, C.C., Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T., Carraway, D.T., Smeltzer, R.H., Joshi, C.P. & Chiang, V.L.** (1999). Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8955-8960.
- Pakusch A.-E., Matern U., Schiltz E.** (1991). Elicitor-inducible caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase from *Petroselinum crispum* cell suspensions. *Plant Physiol.* **95**, 137-143.
- Parvathi, K., Chen, F., Guo, D., Blount, J.W. & Dixon, R.A.** (2001). Substrate preferences of *O*-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-*O*-methylation of monolignols. *Plant J.* **25**, 193-202.
- Pathak, M.A., Daniels, F. & Fitzpatrick, T.B.** (1962). The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *J. Invest. Dermatol.* **39**, 225-239.
- Pathak, M.A. & Fitzpatrick, T.B.** (1992). The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J. Photochem. Photobiol. B.* **14**, 3-22.
- Pathak, M.A., Parrish, J.A. & Fitzpatrick, T.B.** (1981). Psoralens in photochemotherapy of skin diseases. *Farmaco* **36**, 479-491.
- Paxton, J.D.** (1982). Phytoalexins – A working redefinition. *Phytopathol. Z.* **101**, 106-109.

- Pedras, M.S.C., Chumala, P.B. & Suchy, M.** (2003). Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*: structures, syntheses and antifungal activity. *Phytochem.* **64**, 949-956.
- Pedras, M.S.C., Okanga, F.I., Zaharia, I.L. & Khan, A.Q.** (2000). Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochem.* **53**, 161-176.
- Pellegrini, L.O.G., Geoffroy, P., Fritig, B. & Legrand, M.** (1993). Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-*O*-methyltransferases induced in tobacco leaves by infection or elicitor treatment. *Plant Physiol.* **103**, 509-517.
- Pierrel, M.A., Batard, Y., Kazmaier, M., Mignotte-Vieux, C., Durst, F. & Werck-Reichhart, D.** (1994). Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast. Substrate specificity of a cinnamate hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* **224**, 835-844.
- Poeydomenge, O., Boudet, A.M. & Grima-Pettenati, J.** (1994). A cDNA encoding *S*-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-*O*-methyltransferase from Eucalyptus. *Plant Physiol.* **105**, 749-750.
- Prapaipong, H., Berenbaum, M.R. & Schuler, M.A.** (1994). Transcriptional regulation of the *Papilio polyxenes* CYP6B1 gene. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3210-3217.
- Pueppke, G., Bolaños-Vásquez, M.C., Werner, D., Bec-Ferté, M.-P., Promé, J.-C. & Krishnan, H.B.** (1998). Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiol.* **117**, 599-606.
- Qutob, D., Huitema, E., Gijzen, M. & Kamoun, S.** (2003). Variation in structure and activity among elicitors from *Phytophthora sojae*. *Mol. Plant. Path.* **4**, 119-124.
- Rabasseda, X.** (1999). Perspectives in the treatment of Parkinson's disease: COMT inhibitors open up new treatment strategies. *Drugs Today* **35**, 701-717.
- Rakwal, R., Hasegawa, M. & Kodama, O.** (1996). A methyltransferase for synthesis of the flavanone phytoalexin sakuranetin in rice leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 732-735.
- Ranjeva, R., Alibert, G. & Boudet, A.M.** (1977). Metabolism of phenolic compounds in Petunia. V. Ability of isolated chloroplasts to synthesise phenolic compounds from phenylalanine. *Plant Sci. Lett.* **10**, 225-234.
- Rech, P., Grima-Pettenati, J. & Boudet, A.M.** (1997). Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases (Y12228).
- Reinold, S. & Hahlbrock, K.** (1996). Biphasic temporal and spatial induction patterns of defense-related mRNAs and proteins in fungus-infected parsley leaves. *Plant Physiol.* **112**, 131-140.
- Sacks, W., Nürnberger, T., Hahlbrock, K. & Scheel, D.** (1995). Molecular characterization of nucleotide sequences encoding the extracellular glycoprotein elicitor from *Phytophthora megasperma*. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 45-55.
- Sahi, J., Reyner, E.L., Bauman, J.N., Gueneva-Boucheva, K., Burleigh, J.E. & Thomas, V. H.** (2002). The effect of bergamottin on diazepam plasma levels and P450 enzymes in beagle dogs. *Drug Metab. Disp.* **30**, 135-140.
- Sahin, S., Hindioglu, U. & Karaduman, A.** (1999). PUVA treatment of vitiligo: a retrospective study of Turkish patients. *Int. J. Dermatol.* **38**, 542-545.
- Sambrook, J. & Russel, D.W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandermann, H. & Strominger, L.** (1972). Purification and properties of C₅₅-isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **247**, 5123-5131.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sato, F., Takeshita, N., Fitch, J.H., Fujiwara, H. & Yamada, Y. (1993). S-adenosyl-L-methionine: scoulerine 9-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochem.* **32**, 659-664.
- Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y., Yoshida, S. & Yamada, Y. (1994). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: norcochlorogenic acid 6-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur. J. Biochem.* **225**, 125-131.
- Scheel, D., Dangl, J.L., Douglas, C., Hauffe, K.D., Herrmann, A., Hoffmann, H., Lozoya, E., Schulz, W. & Hahlbrock, K. (1987). Stimulation of phenylpropanoid pathways by environmental factors. *Plant Mol. Biol.* 315-326.
- Schlatter, J., Zimmerli, B., Dick, R., Panizzon, R. & Schlatter, C. (1991). Diet intake and risk assessment of phototoxic furocoumarins in humans. *Food Chem. Toxicol.* **29**, 523-530.
- Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W. & Cheng, X. (1995). Universal catalytic domain structure of adomet-dependent methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **247**, 16-20.
- Schmitt, D., Pakusch, A.E. & Matern, U. (1991). Molecular cloning, induction, and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *J. Biol. Chem.* **266**, 17416-17423.
- Schönberg, A. & Sina, A. (1948). Xanthotoxin from the fruits of *Ammi majus* L. *Nature* **161**, 481-482.
- Schröder, M., Hahlbrock, K. & Kombrink, E. (1992). Temporal and spatial patterns of 1,3-β-glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Plant J.* **2**, 161-172.
- Schröder, G., Wehinger, E. & Schroeder, J. (2002). Predicting the substrates of cloned plant O-methyltransferases. *Phytochem.* **59**(1), 1-8.
- Schubert, H.L., Blumenthal, R.M. & Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 329-335.
- Sequera, L. (1983). Mechanisms of induced resistance in plants. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 51-79.
- Sessa, R.A., Bennett, M.H., Lewis, M.J., Mansfield, J.W. & Beale, M.H. (2000). Metabolite profiling of sesquiterpene lactone from *Lactuca* species. *J. Biol. Chem.* **35**, 26877-26884.
- Sewalt, V.J.H., Ni, W., Jung, H. & Dixon, R.A. (1997). Lignin impact on fiber degradation: increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems reduced in lignin content. *Agric. Food Chem.* **45**, 1977-1983.
- Sharp, J.K., Valent, B. & Albersheim, P. (1984). Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* **259**, 11312-11320.
- Sharma, S.K., Garrett, J.M. & Brown, S.A. (1979). Separation of the S-adenosylmethionine:5- and 8-hydroxyfuranocoumarin O-methyltransferases of *Ruta graveolens* L. by general ligand affinity chromatography. *Z. Naturforsch.* **34c**, 387-391.
- Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisanté-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisar, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R.D., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H.Y., Shinar, E., Beckmann, J.S., Yakir, B., Risch, N., Zak, N.B. & Darvasi, A. (2002). A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1296-1302.
- Silvan, A.M., Abad, M.J., Bermejo, P., Sollhuber, M. & Villar, A. (1996). Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *J. Nat. Prod.* **59**, 1183-1185.
- Singab, A.N.B. (1998). Acetylated flavonol triglycosides from *Ammi majus* L. *Phytochem.* **49**, 2177-2180.

- Specker, S.** (2004). Klonierung von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen aus *Ammi majus* L. und funktionelle Expression der Zimtsäure 4-Hydroxylase. Dissertation, Universität Marburg.
- Stanjek, V., Herhaus, C., Ritgen, U., Boland, W. & Städler, E.** (1997a). Changes in the leaf surface chemistry of *Apium graveolens* (Apiaceae) stimulated by jasmonic acid and perceived by a specialist insect. *Helv. Chim. Acta* **80**, 1408-1420.
- Stanjek, V., Miksch, M. & Boland, W.** (1997b). Stereoselective syntheses of deuterium labelled marmesins; valuable metabolic probes for mechanistic studies in furanocoumarin biosynthesis. *Tetrahedron* **53**, 17699-17710.
- Stanjek, V., Miksch, M., Lüer, P., Matern, U. & Boland, W.** (1999b). Biosynthese des Psoralens: zum Mechanismus einer Cytochrom-P450-katalysierten, oxidativen Bindungsspaltung. *Angew. Chem.* **111**, 413-415.
- Stanjek, V., Piel, J. & Boland, W.** (1999a). Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae). *Phytochem.* **50**, 1141-1145.
- Stevenson, P.C., Simmonds, M.S.J., Yule, M.A., Veitch, N.C., Kite, G.C., Irwin, D. & Legg, M.** (2003). Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium daniellii*. *Phytochem.* **63**, 41-46.
- Stoker, J.R.** (1964). The biosynthesis of coumarin in *Melilotus alba*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 17-20.
- Strauss, U., Wissel, K., Jung, S., Wulff, H., Hansel, W., Zhu, J., Rolfs, A. & Mix, E.** (2000). K(+) channel-blocking alkoxy-psoralens inhibit the immune response of encephalitogenic T line cells and lymphocytes from Lewis rats challenged for experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacology* **48**, 51-63.
- Tada, Y., Shikishima, Y., Takaishi, Y., Shibata, H., Higuti, T. Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O.K., Ashurmetov, O. & Ohmoto, Y.** (2002). Coumarins and ?-pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochem.* **59**, 649-654.
- Tietjen, K.G., Hunkler, D. & Matern, U.** (1983). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 1. Identification of induced products as coumarin derivatives. *Eur. J. Biochem.* **131**, 401-407.
- Tietjen, K.G. & Matern, U.** (1983). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 2. Effects on enzyme activities. *Eur. J. Biochem.* **131**, 409-413.
- Thompson, H.J., Sharma, S.K. & Brown, S.A.** (1978). *O*-methyltransferases of furanocoumarin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **188**, 272-281.
- Toquin, V., Grausem, B., Geoffrey, P. & Legrand, M.** (2003). Structure of the tobacco caffeic acid *O*-methyltransferase (COMT) II gene: identification of promotor sequences involved in gene inducibility by various stimuli. *Plant Mol. Biol.* **52**, 495-509.
- Trumble, J.T., Dercks, W., Quiros, C.F. & Beier, R.C.** (1990). Host plant resistance and linear furanocoumarin content of *Apium* accessions. *J. Econ. Entomol.* **83**, 519-525.
- Tsai, C.-J., Podila, G.K. & Chiang, V.L.C.** (1995). Nucleotide sequence of a *Populus tremuloides* gene encoding bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase. *Plant Physiol.* **107**, 1459-1459.
- Vidgren, J., Svensson, L.A. & Liijas, A.** (1994). Crystal structure of catechol *O*-methyltransferase. *Nature* **368**, 354-358.
- Wang, J. & Pichersky, E.** (1999). Identification of specific residues involved in substrate discrimination in two plant *O*-methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 172-180.

- Wellmann, F.** (2002). Molekulare und strukturelle Charakterisierung der Flavonolsynthase aus *Citrus unshiu*. Dissertation, Universität Marburg.
- Wendorff, H. & Matern, U.** (1986). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. Microsomal conversion of (+)marmesin into psoralen. *Eur. J. Biochem.* **161**, 391-398.
- Ye, Z.-H., Kneusel, R.E., Matern, U. & Varner, J.E.** (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell* **6**, 1427-1439.
- Ye, Z.-H. & Varner, J.E.** (1995). Differential expression of two *O*-methyltransferases in lignin biosynthesis in *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* **108**, 459-467.
- Ye, Z.H., Zhong, R., Morrison III, W.H. & Himmelsbach, D.S.** (2001). Caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase and lignin biosynthesis. *Phytochem.* **57**, 1177-1185.
- Ylstra, B., Touraev, A., Moreno, B., Stoger, E., van Thunen, A.J., Vincente, O., Mol, J.N.M. & Heberich-Brors, E.** (1992). Flavonols stimulate development, germination and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol.* **100**, 902-907.
- Yorgey, P., Lee, J., Kördel, J., Vivas, E., Warner, P., Jebaratnam, D. & Kolter, R.** (1994). Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4519-4523.
- Zhang, H., Wang, J. & Goodman, H.M.** (1997). An Arabidopsis gene encoding a putative 14-3-3-interacting protein, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1353**, 199-202.
- Zhong, R., Morrison, W.H., Himmelsbach, D.S., Poole, F.L. & Ye, Z.H.** (2000). Essential role of caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiol.* **124**, 563-577.
- Zhou, P., Takaishi, Y., Duan, H., Chen, B., Honda, G., Itoh, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O.K. & Lee, K.-H.** (2000). Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochem.* **53**, 689-697.
- Zhu, B.T., Ezell, E.L. & Liehr, J.G.** (1994). Catechol *O*-methyltransferase-catalyzed rapid *O*-methylation of mutagenic flavonoids. *J. Biol. Chem.* **269**, 292-299.
- Zobel, A.M. & March, R.E.** (1993). Autofluorescence reveals different histological localizations of furanocoumarins in fruit of some Umbelliferae and Leguminosae. *Annals of Botany* **71**, 251-255.
- Zubieta, C., He, X.-Z., Dixon, R.A. & Noel, J.P.** (2001). Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant *O*-methyltransferases. *Nature Struct. Biol.* **8**, 271-279.
- Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J.-L., Dixon, R.A. & Noel, J.P.** (2002). Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-*O*-methyltransferase. *Plant Cell* **14**, 1265-1277.
- Zubieta, C., Ross, J.R., Koscheski, P., Yang, Y., Pichersky, E. & Noel, J.P.** (2003). Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell* **15**, 1704-1716.

Danksagung

Als erstes danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Matern für die Auswahl des interessanten Themas und für die zahlreichen, sehr wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Richard Lukacin für die intensive Betreuung der Arbeit im Labor und seine hilfreichen praktischen Tipps.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. Stefan Martens für seine wertvolle Unterstützung, vor allem auf dem Gebiet der RACE-Methodik.

Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und die Aufnahme in seinen Arbeitskreis zur Durchführung von Klonierungsversuchen.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Frau Oxana Panajotow für die Unterstützung bei diesen Versuchen.

Frau Britta Rohde danke ich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Molekulargewichtsbestimmungen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts und besonders den Doktoranden der Arbeitskreise Matern und Petersen für die immer gute Teamarbeit und die freundliche Atmosphäre im Labor. Frau Prof. Dr. Maike Petersen danke ich für die stets hilfreiche und sehr angenehme Zusammenarbeit.

Unschätzbare Dank gebührt nicht zuletzt all denjenigen, die mich in der gesamten Zeit der Promotion unterstützt haben: Meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Freunden und meiner Freundin Ines Meyer.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Marc Hehmann
Geburtsdatum: 16.09.1974
Geburtsort: Georgsmarienhütte
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

08/1981 – 07/1985 Grundschule Overberg in Osnabrück
08/1985 – 06/1987 Orientierungsstufe Dom in Osnabrück
08/1987 – 06/1994 Gymnasium Carolinum Osnabrück
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium:

10/1995 – 10/1999 Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg
09/1997 Erstes Staatsexamen
10/1999 Zweites Staatsexamen
11/2000 Drittes Staatsexamen und Erhalt der Approbation als Apotheker

Praktische Ausbildung:

11/1999 – 04/2000 Engel-Apotheke, Marburg
05/2000 – 10/2000 Bayer AG, Monheim, Abteilung Tiergesundheit

Promotion:

seit 01/2001 Anfertigen der Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Matern am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg

Berufliche Tätigkeit:

seit 01/2004 Regulatory Affairs Manager bei der Salutas Pharma GmbH, einer Tochtergesellschaft der Hexal AG

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Klonierung von *O*-Methyltransferasen zur Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* L.“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 17. Mai 2004

Marc Hehmann