

**Isolation von Salizylsäure- und Benzoessäure-
Carboxyl-Methyltransferasen aus verschiedenen
Nicotiana-Arten**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Frank Hippauf

Rostock, 12.05.2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0095-4

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Piechulla
Universität Rostock
Inst. für Biowissenschaften
Biochemie

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Schwab
Technische Universität München
Biomolekulare Lebensmitteltechnologie

Tag der Promotion: 15. 09. 2008

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	VII
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1 Sekundärmetabolismus bei Pflanzen.....	1
1.2 O-Methyltransferasen bei Pflanzen.....	2
1.2.1 SABATH-Methyltransferasen.....	3
1.3 Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen.....	6
1.3.1 Vorkommen und Bedeutung von Salizylsäure, Benzoessäure, Methylsalizylat und Methylbenzoat in Pflanzen.....	7
1.3.2 Synthese von Benzoessäure und Salizylsäure.....	11
1.4 Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen und der Blütenduft...	12
1.5 Zielstellung der Doktorarbeit.....	14
1.6 Verwendete Pflanzen.....	15
1.6.1 <i>Nicotiana suaveolens</i> Lehm.....	15
1.6.2 <i>Nicotiana alata</i> Link & Otto.....	16
1.6.3 <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes.....	16
<u>2. Material und Methoden</u>	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Molekularbiologische Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.3 Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	19
2.1.4 Plasmide.....	19
2.1.5 Oligonukleotidsequenzen.....	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Verwendete Pflanzen und Pflanzenanzucht.....	20
2.2.2 Isolation von Gesamt-RNA	21
2.2.2.1 Gesamt-RNA Extraktion nach Chang et al. (1993); modifiziert.....	21
2.2.3 Isolation von DNA nach Khanuja et al. (1999).....	22
2.2.4 Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	22

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	23
2.2.6 Agarose Gelelektrophorese.....	23
2.2.6.1 Agarose Gelelektrophorese von DNA.....	23
2.2.6.2 Denaturierende Agarose Gelelektrophorese von RNA.....	24
2.2.7 Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	24
2.2.8 Herstellung eines Vektors mit 3' T- Überhang.....	24
2.2.9 Ligation von DNA in Vektoren.....	25
2.2.10 Herstellung und Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i> Zellen..	26
2.2.11 RT-PCR und PCR.....	27
2.2.11.1 Suche nach potentiellen BSMTs.....	27
2.2.11.2 Identifizierung von 5'UTR-Bereichen.....	29
2.2.11.2.1 DNase I-Verdau.....	30
2.2.11.2.2 Identifizierung von 5'UTR-Bereichen mittels RT-PCR.....	30
2.2.11.2.3 Identifizierung von 5'UTR-Bereichen mittels 5'RACE.....	31
2.2.11.3 Identifizierung der 3'UTR-Bereiche.....	33
2.2.11.3.1 Identifizierung der 3'UTR-Bereiche mittels RT-PCR.....	34
2.2.11.3.2 Identifizierung von 3'UTR-Bereichen mittels 3'RACE.....	36
2.2.11.4 Amplifizierung der codierenden Bereiche.....	38
2.2.11.5 Expressionsuntersuchungen mittels RT-PCR.....	40
2.2.11.5.1 Expressionsuntersuchungen der potentiellen BSMTs und SAMTs aus <i>N. sylvestris</i> und <i>N. alata</i>	40
2.2.11.5.2 Untersuchung der Induzierbarkeit der potentiellen BSMTs und SAMTs aus <i>N. sylvestris</i> und <i>N. alata</i>	41
2.2.11.5.3 Standardisierung der Expressionsuntersuchungen mittels EF1 α	42
2.2.11.6 Kolonie PCR.....	42
2.2.12 Sequenzierung.....	43
2.2.13 Überexpression der heterolog in <i>E. coli</i> exprimierten Enzyme.....	43
2.2.14 Aufreinigung von überexprimierten Enzymen.....	44
2.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	45
2.2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
2.2.17 Coomassiefärbung.....	47
2.2.18 Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	47
2.2.19 GC-MS Analysen.....	49

2.2.19.1 Funktionsnachweis der überexprimierten Enzyme durch GC-MS.....	49
2.2.19.2 Bestimmung des Blütenduftes von <i>N. suaveolens</i> , <i>N. alata</i> und <i>N. sylvestris</i> mittels GC-MS.....	50
2.2.20 Aktivitätstest der heterolog exprimierten und aufgereinigten Enzyme....	50
2.2.20.1 Untersuchung der Substratspezifität.....	51
3. Ergebnisse.....	53
3.1 <i>N. suaveolens</i>	53
3.1.1 Potentielle BSMT.....	53
3.1.1.1 Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene.....	53
3.1.1.2 Expressionsüberprüfung.....	56
3.1.1.3 Kompletierung der 3'- und 5'-Region.....	57
3.1.1.4 Heterologe Expression.....	59
3.1.1.5 Überexpression der potentiellen BSMT aus <i>N. suaveolens</i>	60
3.1.1.6 Bestimmung der Substratspezifität.....	61
3.1.2 N.sua.BSMT1-2.....	63
3.1.2.1 3'RACE.....	63
3.1.2.2 Überexpression der N.sua.BSMT1-2 aus <i>N. suaveolens</i>	64
3.1.2.3 Bestimmung der Substratspezifität.....	64
3.1.3 Potentielle SAMT.....	65
3.1.3.1 Suche potentieller SAMT in <i>N. suaveolens</i>	65
3.1.3.2 Kompletierung der 3'- und 5'-Region.....	65
3.1.3.3 Heterologe Expression.....	66
3.1.3.4 Überexpression der N.sua.SAMT1 aus <i>N. suaveolens</i>	67
3.1.3.5 Bestimmung der Substratspezifität.....	68
3.2 <i>N. alata</i>	69
3.2.1 Potentielle BSMT.....	69
3.2.1.1 Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene.....	69
3.2.1.2 Expressionsüberprüfung.....	70
3.2.1.3 Kompletierung der 3'- und 5'-Region.....	71
3.2.1.4 Heterologe Expression.....	72
3.2.1.5 Überexpression der N.ala.BSMT2-1 aus <i>N. alata</i>	72

3.2.1.6 Bestimmung der Substratspezifität.....	73
3.2.1.7 Expressionsuntersuchungen.....	74
3.2.1.8 Regulation der <i>N.ala</i> .BSMT2-1 Expression.....	75
3.2.2 Potentielle <i>N.ala</i> .SAMT.....	76
3.2.2.1 Expressionsnachweis.....	76
3.2.2.2 Komplettierung der 3'- und 5'-Region.....	77
3.2.2.3 Heterologe Expression.....	78
3.2.2.4 Überexpression der <i>N.ala</i> .SAMT1 aus <i>N. alata</i>	79
3.2.2.5 Bestimmung der Substratspezifität.....	79
3.2.2.6 Expressionsuntersuchungen.....	80
3.2.2.7 Regulation der <i>N.ala</i> .SAMT1 Expression.....	81
3.3 <i>N. sylvestris</i>	82
3.3.1 Potentielle BSMT.....	82
3.3.1.1 Expressionsüberprüfung.....	82
3.3.1.2 Komplettierung der 3'- und 5'-Region.....	83
3.3.1.3 Heterologe Expression.....	84
3.3.1.4 Überexpression der <i>N.syl</i> .BSMT2-1 aus <i>N. sylvestris</i>	84
3.3.1.5 Bestimmung der Substratspezifität.....	85
3.3.1.6 Expressionsuntersuchungen.....	86
3.3.1.7 Regulation der <i>N.syl</i> .BSMT2-1 Expression.....	87
3.3.2 Potentielle <i>N.syl</i> .SAMT.....	88
3.3.2.1 Expressionsnachweis.....	88
3.3.2.2 Komplettierung der 3'- und 5'-Region.....	88
3.3.2.3 Heterologe Expression.....	89
3.3.2.4 Überexpression der <i>N.syl</i> .SAMT1 aus <i>N. sylvestris</i>	90
3.3.2.5 Bestimmung der Substratspezifität.....	91
3.3.2.6 Expressionsuntersuchungen.....	91
3.3.2.7 Induzierbarkeit der <i>N.syl</i> .SAMT1 Expression.....	92
3.4 <i>N. gossei</i>	93
3.4.1 Potentielle BSMT.....	93
3.4.1.1 Amplifizierung und Überexpression der potentiellen BSMT aus <i>N. gossei</i>	93
3.4.1.2 Bestimmung der Substratspezifität.....	94

3.5 Suche nach potentiellen BSMTs in <i>N. sylvestris</i> , <i>N. alata</i> und <i>N. tomentosiformis</i> mittels RT-PCR.....	95
3.6 Blütenduft von <i>N. suaveolens</i> , <i>N. alata</i> und <i>N. sylvestris</i>	96
3.7 Übergreifende und zusammenfassende Betrachtungen der identifizierten Enzyme..	97
<u>4. Diskussion</u>	102
4.1 Isolation von SAMT- und BSMT- Sequenzen und deren phylogenetische Einordnung.....	103
4.2 Überexpression und Bestimmung der Substratspezifität der BSMTs und SAMTs...	110
4.3 Expression und mögliche Funktion der SAMTs und BSMTs in den untersuchten <i>Nicotiana</i> -Arten.....	116
4.4 SAMTs, BSMTs und der Blütenduft der Solanaceae.....	122
<u>5. Literaturverzeichnis</u>	125
<u>6. Anhang</u>	143
Abkürzungsverzeichnis.....	143
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	146
6.1 Übersicht der Identitäten, der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT- und SAMT-Sequenzen, im Vergleich mit bereits beschriebenen Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen.....	151
6.2 Verwendete synthetische Oligonukleotide.....	152
6.3 Isolierte Sequenzen.....	153
6.3.1 cDNA Sequenzen.....	153
6.3.1.1 Identifizierte Sequenzen aus <i>N. suaveolens</i>	153
6.3.1.2 Identifizierte Sequenzen aus <i>N. alata</i>	155
6.3.1.3 Identifizierte Sequenzen aus <i>N. sylvestris</i>	158
6.3.1.4 Identifizierte Sequenzen aus <i>N. tomentosiformis</i>	160
6.3.2 Genomische Sequenzen.....	161
6.3.2.1 Identifizierte Sequenzen aus <i>N. suaveolens</i>	161
6.3.2.1.1 Alignements.....	164
6.3.2.2 Identifizierte Sequenzen aus <i>N. alata</i>	174

6.3.2.2.1 Alignements.....	174
6.3.2.3 Identifizierte Sequenzen aus <i>N. sylvestris</i>	176
6.4 GC-MS Analysen.....	176
6.4.1 Testung der heterolog exprimierten Enzyme mit verschiedenen Substraten.....	176
6.4.2 Messung von Blütenduft mittels GC-MS.....	187
6.4.2.1 Blütenduft <i>N. sylvestris</i>	187
6.4.2.2 Blütenduft <i>N. alata</i>	189

Zusammenfassung

SAMTs (salicylic acid carboxyl methyltransferases) und BSMTs (benzoic acid/ salicylic acid carboxyl methyltransferases) katalysieren die Synthese von Methylsalizylat (MSA) und Methylbenzoat (MBA). Diese flüchtigen Verbindungen sind häufig Bestandteile im Blütenduft vieler Pflanzen, wo sie der Anlockung potentieller Bestäuber dienen. Für MSA konnte zudem eine wichtige Funktion in der Pathogenabwehr nachgewiesen werden, wo es vermutlich als mobiles Signal für die Auslösung der SAR dient.

Diese Arbeit beschreibt die Isolation und Überexpression von SAMTs und BSMTs aus den Solanaceen *N. suaveolens*, *N. alata* und *N. sylvestris*. Aus allen drei Arten konnte jeweils eine SAMT (N.sua.SAMT1; N.ala.SAMT1; N.syl.SAMT1) und eine BSMT (N.sua.BSMT2-1; N.ala.BSMT2-1; N.syl.BSMT2-1) isoliert werden. Mittels molekularbiologischer Techniken, z.B. der 3'RACE und 5'RACE war es möglich, die Gensequenzen zu komplettieren. Die SAMTs besitzen alle eine Länge von 358 Aminosäuren und weisen zueinander eine Identität zwischen 93,3 % - 96,4 % auf. Sie zeigen eine hohe relative Aktivität mit Salizylsäure, können aber in geringem Umfang auch Benzoesäure methylieren. Die isolierten BSMTs besitzen eine Länge von 386 (N.syl.BSMT2-1) bzw. 387 (N.sua.BSMT2-1 und N.ala.BSMT2-1) Aminosäuren. Zwischen ihnen bestehen Identitäten zwischen 86 % - 86,3 %. In den durchgeführten Überexpressionsuntersuchungen bevorzugten sie Benzoesäure gegenüber der Salizylsäure als Substrat. Zusätzlich zu den oben genannten Enzymen konnten noch Teile weiterer potentieller BSMTs aus *N. suaveolens* (N.sua.BSMT3-1) und *N. alata* (N.ala.BSMT3-1) isoliert werden.

Expressionsuntersuchungen zeigten, dass die N.ala.SAMT1 aus *N. alata* in allen Organen und zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert wird, während sich die N.syl.SAMT1 aus *N. sylvestris* nur in den Wurzeln nachweisen ließ. Die Expression beider Gene war durch Salizylsäure induzierbar. Die Expression der BSMTs aus *N. alata* und *N. sylvestris* konnte in allen Organen außer den Wurzeln nachgewiesen werden und war nicht durch Salizylsäure induzierbar.

Die phylogenetische Betrachtung der isolierten Sequenzen weist auf eine konvergente Entwicklung der SAMTs und BSMTs hin, wobei sie sich vermutlich auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückführen lassen.

Die Expressionsuntersuchung und die Bestimmung der Substratspezifität der SAMTs und BSMTs lässt eher eine Funktion dieser Enzyme in der Pathogenabwehr der Pflanze, als eine Beteiligung bei der Synthese von Blütenduft erwarten. Zudem kann aufgrund der

unterschiedlichen Expressionsmuster angenommen werden, dass die BSMT und die SAMT verschiedene Funktionen in den untersuchten *Nicotiana*-Arten wahrnehmen.

1. Einleitung

1.1 Sekundärmetabolismus bei Pflanzen

Für das Überleben der Pflanzen ist ein komplexer Metabolismus essentiell. Er stellt die Voraussetzung dafür dar, auf die unterschiedlichsten oft wechselnden Umwelteinflüsse angemessen zu reagieren. Um dies zu erreichen, muss jede Pflanze in der Lage sein, ihre gesamten Stoffwechselwege sowohl auf abiotische Faktoren wie der Temperatur, der Lichteinstrahlung, der Wasser- und Nährstoffversorgung wie auch auf biotische Faktoren, zum Beispiel Pathogen- und Herbivorenbefall, ständig neu abzustimmen. Aus diesem Grund besitzen die Pflanzen neben dem Primärmetabolismus meist einen ausgeprägten so genannten Sekundärmetabolismus. Während die Stoffwechselwege und deren Produkte im Primärmetabolismus für alle Zellen und Organismen weitestgehend gleich sind und direkte Bedeutung für das Überleben besitzen, sind die im Sekundärmetabolismus gebildeten Verbindungen oft auf einzelne Organismengruppen beschränkt und nicht direkt für das Überleben der Zellen und Organismen notwendig (Bennet und Bentley, 1989; Verpoorte, 2000). Die Bedeutung der im Sekundärmetabolismus gebildeten Verbindungen liegt vermutlich in der Interaktion der Zellen bzw. Organismen mit ihrer Umwelt, wodurch die individuelle Fitness in ihrem Ökosystem erhöht wird (Verpoorte, 2000; Nugroho und Verpoorte, 2002). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden bereits mehr als 100 000 verschiedene Sekundärmetabolite aus Pflanzen isoliert (Verpoorte, 2000; Noel et al., 2003). Es wird vermutet, dass die Zahl an unterschiedlichen Verbindungen noch weitaus höher liegen könnte und möglicherweise erst ca. 10 % der tatsächlich existenten Verbindungen nachgewiesen wurden (Schwab, 2003). Überraschenderweise lässt sich der Großteil dieser Verbindungen auf nur wenige Substanzklassen zurückführen. So handelt es sich vorzugsweise um Isoprenoide, Alkaloide und Phenylpropanoide (Noel et al., 2003). Eine Erklärung für die große Menge an gebildeten Verbindungen liegt in der hohen Vielfalt an unterschiedlichen Reaktionsmöglichkeiten innerhalb dieser Substanzklassen. Zudem wird die Menge an unterschiedlichen Sekundärmetaboliten durch zusätzliche Modifizierungen erhöht. Eine weit verbreitete Möglichkeit der Modifizierung stellt die Methylierung dar. Methylierungen sind für beinahe alle Klassen pflanzlicher Sekundärmetabolite bekannt, inklusive Alkaloiden, Phenylpropanoiden, Zuckern, Purinen, Sterolen, Thiolen und Flavonoiden (D'Auria et al., 2003). Die Übertragung der Methylgruppen erfolgt vor allem auf C, N, S, oder O-Atome (D'Auria et al., 2003).

1.2 O-Methyltransferasen bei Pflanzen

Die größte Gruppe der methylierten Metabolite stellen die O-Methylether und O-Methylester dar (D'Auria et al., 2003). Diese Verbindungen werden durch Methylierung von Hydroxyl-, bzw. Carboxylgruppen gebildet. Die synthetisierenden Enzyme werden als O-Methyltransferasen bezeichnet (Ibrahim et al., 1998; Noel et al., 2003).

Als Methylgruppendonator für diese Reaktionen wird zumeist das S-Adenosylmethionin (SAM) verwendet (Ibrahim et al., 1998; Zubieta et al., 2001). SAM wird durch die Übertragung einer Adenosylgruppe von ATP auf das Schwefelatom eines Methionins gebildet. Durch die positive Ladung des benachbarten Schwefelatoms wird die Methylgruppe des Methionins aktiviert, wodurch SAM ein hohes Gruppenübertragungspotential besitzt. Das bei der Methylierungsreaktion aus SAM gebildete S-Adenosylhomocystein (SAH) wird anschließend zu Adenosin und Homocystein hydrolysiert (Lieber und Packer, 2002). Aus Homocystein wird unter Beteiligung von N⁵-Methyltetrahydrofolat Methionin regeneriert (Ravanel et al., 2004). Das N⁵-Methyltetrahydrofolat stellt einen zweiten gebräuchlichen Methylgruppendonator in Pflanzen dar, allerdings besitzt es im Vergleich zu SAM nur ein geringes Methylgruppenübertragungspotential.

Die Klassifizierung der pflanzlichen O-Methyltransferasen kann aufgrund ihrer Sequenzen und Strukturen erfolgen (Ibrahim, 1997; Ibrahim et al., 1998; D'Auria et al., 2003; Noel et al., 2003). In Ibrahim et al. (1998) wurde eine Einteilung in 4 Klassen (Klasse A-D), welche sich wiederum in einzelne Gruppen unterteilen ließen, vorgeschlagen. Zur „Klasse A“, die sich in 5 Gruppen unterteilen ließ, zählten alle Phenylpropanoid methylierenden Enzyme. Flavonoid methylierende Enzyme wurden in die 4 Gruppen umfassende „Klasse B“ eingruppiert. Zur „Klasse C“ gehörten alle Alkaloid methylierenden Proteine. Sie ließ sich in 3 Gruppen unterteilen. Die „Klasse D“ sollten zuletzt die Enzyme umfassen, welche alle restlichen Substanzen wie aliphatische Verbindungen und Zucker methylieren konnten.

Noel et al. (2003) unterschied zwischen 3 Typen von O-Methyltransferasen. Die Enzyme des ersten Typs methylieren ausschließlich Hydroxylgruppen von Phenylpropanoiden. Die O-Methyltransferasen des zweiten Typs sind spezifisch für Phenylpropanoide die Coenzym A (CoA) gebunden enthalten. Zu dem dritten Typ pflanzlicher Methyltransferasen zählen Enzyme, welche vorzugsweise Carboxylgruppen methylieren. Weiterhin enthält dieser Typ noch einige Alkaloid methylierenden N-Methyltransferasen.

Die Unterschiede zwischen diesen 3 Enzymtypen finden sich auch in ihrer Struktur. Die Typ 1 O-Methyltransferasen, zu denen beispielsweise die Chalcon-O-Methyltransferase (ChOMT)

und die Isoflavon-O-Methyltransferase (IOMT) aus *Medicago sativa* gehören (Maxwell et al., 1992; Maxwell et al., 1993; He und Dixon, 1996), bilden symmetrische Homodimere (Zubieta et al., 2001). Sie besitzen eine C-terminale katalytische Domäne, welche für die SAM- und Substrat Bindung sowie für die Methylierung wichtig ist und eine kleinere N-terminale Domäne, die primär für die Dimerisation Bedeutung besitzt.

Zu den Typ 2 O-Methyltransferasen zählt zum Beispiel die Kaffeoyle/ 5-Hydroxyferuloyl Coenzym-A 3/5-O-Methyltransferase (CCoAOMT). Sie methyliert vorzugsweise Kaffeoyle-CoA und spielt eine wichtige Rolle bei der Lignin Biosynthese (Ye et al., 1994; Meng und Campbell, 1998; Parvathi et al., 2001; Ye et al., 2001). Die Typ 2- OMTs sind hoch spezifisch für CoA-Ester und zeigen innerhalb der Pflanzen hohe Identitäten von ca. 50 % – 90 % (Noel et al., 2003). Sie bilden ebenfalls wie die Typ 1 O-Methyltransferasen Homodimere (Inoue et al., 1998). Die Dimerisation erfolgt jedoch auf einem komplett anderen Weg, da ihnen die N-terminale Dimerisierungsdomäne fehlt. Sie wird über verschiedene Aminosäuren und vorwiegend hydrophobe Interaktionen erreicht. Bei der CCoAOMT konnte zudem ein Calcium-Ion in der aktiven Tasche nachgewiesen werden (Vidgren et al., 1994; Ibrahim et al., 1998).

Von dem Typ 3 Methyltransferasen werden vor allem Carboxylgruppen aber auch Stickstoffatome von manchen Alkaloiden methyliert (Kato et al., 1999; Kato et al., 2000; Ogawa et al., 2001; Noel et al., 2003). Dieser Typ wird basierend auf den ersten drei charakterisierten Genen („salicylic acid methyltransferase“, „benzoic acid methyltransferase“, Theobromin-Synthase), auch als SABATH-Familie bezeichnet (D'Auria et al., 2003).

1.2.1 SABATH-Methyltransferasen

Die Enzyme dieses Typs liegen vermutlich zytosolisch als Homodimere vor (Kolossova et al., 2001a; Ogawa et al., 2001). Die Untereinheiten der Enzyme besitzen ein Molekulargewicht von ca. 40-49 kDa (D'Auria et al., 2003). Durch Röntgenstrukturanalyse konnte bereits die dreidimensionale Struktur der SAMT aus *Clarkia breweri* bestimmt werden (Zubieta et al., 2003). Dieses Enzym wurde ursprünglich aus den Petalen von *C. breweri* isoliert, wo es für die Synthese des im Blütenduft enthaltenen Methylsalizylats verantwortlich ist (Ross et al., 1999). Es besitzt eine Größe von 359 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 41 kDa. Die Röntgenstrukturanalyse der SAMT hat gezeigt, dass jedes Monomer jeweils aus einer globulären Domäne besteht, welche ausgedehnte β -Faltblattstrukturen und eine α -helikale Kappe besitzt. Die Dimerisierungsdomäne ist im Vergleich zu den zuvor beschriebenen O-

Methyltransferasetypen ausgesprochen klein. Sie beträgt nur ca. 7 % der für die Dimerisierung zur Verfügung stehenden Oberfläche. Die aktiven Taschen der Homodimere sind isoliert voneinander und wirken nicht zusammen (Zubieta et al., 2003). Die Bindung des S-Adenosylhomocysteins, welches aufgrund der höheren Stabilität gegenüber SAM in der Röntgenstrukturanalyse verwendet wurde, erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte. Wasserstoffbrücken werden zwischen einem Aspartat an Position 98 (Asp-98) und beiden Hydroxylgruppen der Ribose, sowie einem Asparagin und einem Aspartat an den Positionen 65 und 57 (Asn-65 und Asp-57) mit dem Carboxylrest des SAH und einem Serin an Position 129 (Ser-129) mit der Aminogruppe des Adenin Rings von SAH erreicht. An den Van-der-Waals-Wechselwirkungen sind ein Leucin an Position 99 (Leu-99) und ein Phenylalanin an Position 130 (Phe-130) beteiligt. Die für die SAM-Bindung benötigten Aminosäuren scheinen innerhalb der SABATH-Familie hoch konserviert zu sein (Effmert et al., 2005).

Für die Bindung der Salizylsäure (SA) sind ein Methionin an Position 150 und 308 von Bedeutung (Met-150 und Met-308). Sie bilden eine „molekulare Klammer“, die den Benzylring der SA in die richtige Position für die Methylierung bringt. Die Carboxylgruppe der SA wird zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Tryptophan und einem Glutamin (Trp-151 und Gln-25) in der aktiven Tasche gebunden (Zubieta et al., 2003).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden bereits mehrere *in silico* Strukturen der aktiven Zentren weiterer Methyltransferasen der SABATH-Familie erstellt (Pott et al., 2004; Kapteyn et al., 2007). Anhand der *in silico* Strukturen ist es möglich, einen tieferen Einblick in die Substratbindung und deren Interaktion mit den Aminosäuren der aktiven Tasche zu erhalten, um auf diesem Weg die Substratspezifitäten der unterschiedlichen Enzyme erklären zu können.

Bei dem größten Teil der bereits isolierten SABATH-Methyltransferasen handelt es sich um Enzyme, welche die flüchtigen Verbindungen Methylbenzoat und Methylsalizylat synthetisieren. Zu diesen Enzymen zählt auch die zuvor beschriebene SAMT aus *C. breweri*. Weiterhin konnten bereits eine Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase und eine Farnesylsäure-Carboxyl-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* (Seo et al., 2001; Yang et al., 2006) sowie mehrere Zimtsäure Methyltransferasen aus *Ocimum basilicum* isoliert werden (Kapteyn et al., 2007). Darüber hinaus wurden in *A. thaliana* Enzyme der SABATH-Familie isoliert, welche in der Lage waren, Phytohormone wie verschiedene Gibberelline bzw. Indol-3-Essigsäure zu methylieren (Qin et al., 2005; Varbanova et al., 2007). Zu guter Letzt konnten auch einige N-Methyltransferasen diesem Enzymtyp zugerechnet werden.

Dabei handelt es sich um die Theobromin-Synthase (CaMXMT) aus *Coffea arabica* und eine Koffein-Synthase (TCS1) aus *Camellia sinensis* (Mazzafera et al., 1994; Kato et al., 1999; Kato et al., 2000; Ogawa et al., 2001).

Innerhalb des *A. thaliana*-Genoms wurden 24 SABATH-Gene und ein Pseudogen identifiziert (D'Auria et al., 2003). Sie sind auf alle fünf Chromosomen verteilt, wobei die Mehrzahl (10 von 24) der Gene auf dem fünften Chromosom liegt. Oft sind sie in Gruppen von 2 – 4 Genen auf den Chromosomen zu finden. Sie besitzen maximal 4 Introns, die an 5 verschiedenen Stellen innerhalb der Gene auftreten können. Die Mehrzahl der gefundenen Gene besitzen jedoch nur 2 (15 von 24) bzw. 3 (7 von 24) Introns (D'Auria et al., 2003). Kürzlich wurde auch das Reis-Genom (*Oryza sativa*) auf die Existenz von SABATH-Genen hin untersucht (Zhao et al., 2008). Insgesamt konnten 41 SABATH-ähnliche Sequenzen identifiziert werden, die auf sieben Chromosomen verteilt sind (Chromosom 1; 2; 4; 5; 6; 10 und 11). Die Mehrzahl der SABATH-Gene aus *O. sativa* (22 von 41) befindet sich jedoch auf dem Chromosom 6.

Auch innerhalb der Solanaceae wurden bereits mehrere Gene der SABATH-Familie isoliert (Fukami et al., 2003; Negre et al., 2003; Pott et al., 2004; Martins und Barkman, 2005). Dabei handelt es sich vor allem um potentielle SAMTs. Die bereits auf genomischer Ebene untersuchten Sequenzen besitzen alle jeweils 3 Introns. Die Lage der Introns innerhalb der verschiedenen Gene ist identisch (Martins und Barkman, 2005).

Phylogenetische Untersuchungen der derzeit aus Datenbanken von unterschiedlichsten Organismen erhältlichen Sequenzen haben gezeigt, dass sich die SABATH-Familie in drei Gruppen unterteilen lässt (Kapteyn et al., 2007). Die erste Gruppe umfasst mikrobielle Sequenzen, welche sich eindeutig von den pflanzlichen Sequenzen unterscheiden lassen. Die zweite Gruppe kann in zwei weitere Untergruppen unterteilt werden. In diesen Untergruppen finden sich beispielsweise die aus *A. thaliana* isolierten Gibberellinsäure-Carboxyl-Methyltransferasen (GAMT), die Indol-3-Essigsäure-Carboxyl-Methyltransferase (IAMT) und die Farnesylsäure-Carboxyl-Methyltransferase (FAMT) (Kapteyn et al., 2007). Weiterhin finden sich in diesen Untergruppen Enzyme aus Monokotyledonen, Koniferen und niederen Pflanzen. Die dritte Gruppe umfasst Sequenzen höherer Pflanzen. Sie enthält die bisher identifizierten SAMTs, BSMTs und uncharakterisierte SAMT-ähnliche Sequenzen von verschiedenen Mono- und Dikotyledonen. Des Weiteren finden sich in dieser Gruppe die JMT aus *A. thaliana* und die verschiedenen N-Methyltransferasen der SABATH-Familie (Kapteyn et al., 2007).

1.3 Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen

Die Mehrheit bereits isolierter Enzyme der SABATH-Familie stellen die Benzoessäure- und Salizylsäure-Carboxyl-Methyltransferasen dar. Sie übertragen mittels SAM eine Methylgruppe auf die Carboxylgruppen der Benzoessäure bzw. Salizylsäure, wodurch die flüchtigen Verbindungen Methylbenzoat und Methylsalizylat gebildet werden. Die synthetisierenden Enzyme werden als Salizylsäure-Carboxyl-Methyltransferasen (SAMT), Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen (BAMT) und Benzoessäure/Salizylsäure-Carboxyl-Methyltransferasen (BSMT) bezeichnet (Abb. 1.1).

In Effmert et al. (2005) wird aufgrund der Substratpräferenz und der katalytischen Effizienz bei den Salizylsäure- und Benzoessäure methylierenden Carboxyl-Methyltransferasen zwischen einem „SAMT-Typ“ und einem „BAMT-Typ“ unterschieden. Die Enzyme aus der Gruppe des SAMT-Typs bevorzugen Salizylsäure gegenüber der Benzoessäure, was sich in einem geringeren K_m -Wert für Salizylsäure und einer höheren katalytischen Effizienz gegenüber Benzoessäure widerspiegelt. Die Enzyme aus der Gruppe des BAMT-Typs zeigen vergleichbare K_m -Werte für Salizylsäure und Benzoessäure, aber eine höhere katalytische Effizienz mit Benzoessäure als Substrat. Ein weiteres Kriterium für die Unterscheidung dieser Typen sind die für die Substratbindung wichtigen Aminosäuren der aktiven Taschen. Während die Aminosäuren der aktiven Tasche der Enzyme des SAMT-Typs hoch konserviert sind, zeigen die Enzyme des BAMT-Typs dort eine höhere Variabilität. Eine Unterscheidungsmöglichkeit der aktiven Zentren besteht in dem Vorhandensein eines Methionins (Met-150 bei *C. breweri*) bei den SAMT-Typen, welches bei den BAMT-Typen durch ein His ersetzt ist (Effmert et al., 2005). Dieses Met-150 bildet zusammen mit einem weiteren Methionin (Met-308 bei *C. breweri*) eine „molekulare Klammer“ und scheint von besonderer Bedeutung für die Bevorzugung der Salizylsäure gegenüber der Benzoessäure als Substrat zu sein. Diese Vermutung konnte bereits durch erste Mutationsstudien untermauert werden (Zubieta et al., 2003; Barkman et al., 2007; Feike, 2007).

Mamestra brassicae L. bevorzugen für ihre Eiablage *Brassicaceae*. Es konnte gezeigt werden, dass diese nach Herbivorenbefall Methylsalizylat emittieren und daraufhin von weiblichen *Mamestra brassicae* L. Motten nicht mehr für die Eiablage gewählt wurden (Ulland et al., 2007). Dieses Verhalten stellt ein Indiz dafür dar, dass die Motten ihre Eier bevorzugt auf gesunde, noch unbefallene Pflanzen legen. Vermutlich spielen ähnliche Mechanismen auch bei der Anlockung von Bestäubern durch Methylsalizylat und Methylbenzoat eine Rolle. Methylsalizylat oder Methylbenzoat wurden neben ihrem Vorkommen im Blütenduft auch in den Früchten und Aromen verschiedener Obst- und Gemüsesorten wie Kiwi, Sternfrucht Pflaumen, Erdbeeren und Tomaten nachgewiesen (Young et al., 1983; Fröhlich und Schreier, 1989; Hermann, 1990). Methylsalizylat wird auch in vegetativen Geweben unterschiedlichster Arten wie Walnuss, Feigen, Tabak und Arabidopsis gebildet (Buttery et al., 1982a; Buttery et al., 1982b; Andersen et al., 1988; Hamilton-Kemp et al., 1988; Ross, 2002; Chen et al., 2003). Neben der Bedeutung als Duft- und Aromastoff sind vor allem Salizylsäure und Methylsalizylat in die Pathogenabwehr der Pflanzen involviert. Es ist schon seit langem bekannt, dass ein überstandener primärer Befall mit unterschiedlichsten Pathogenen den befallenen Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen sekundäre Infektionen verleihen kann (Chester, 1933; Delaney, 2004). Ross konnte 1961 zeigen, dass eine überlebte primäre Infektion von *Nicotiana tabacum* mit dem Tabakmosaikvirus (TMV) zu einer erhöhten Resistenz in der gesamten Pflanze gegenüber einem weiteren Befall mit dem TMV und anderen Pathogenen führte (Ross, 1961a; Ross, 1961b; Ryals et al., 1994). Dieses Phänomen wurde von ihm als systemisch erworbene Resistenz („systemic acquired resistance“) bezeichnet. Die systemisch erworbene Resistenz (SAR) wird meist als Folge der hypersensitiven Reaktion („hypersensitive response“) beobachtet, welche sich visuell im Auftreten von Nekrosen, hervorgerufen durch das lokale Absterben von Zellen, äußert (Ryals et al., 1996; Delaney, 2004; Watanabe und Lam, 2006). Im Rahmen der hypersensitiven Reaktion (HR) kommt es zu einem Anstieg von reaktiven Sauerstoffintermediaten, wie Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen und der Neusynthese von verschiedenen Proteinen, die zusammenfassend als „pathogenesis related (PR) proteins“ bezeichnet werden (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Ryals et al., 1996; Lamb und Dixon, 1997). Bei den gebildeten Proteinen handelt es sich beispielsweise um Chitinasen und Glucanasen oder Enzyme für die Synthese von Phytoalexinen (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Ryals et al., 1996). Weiterhin ist die HR mit einem Anstieg des Salizylsäurelevels gekoppelt. Es wurde gezeigt, dass die Salizylsäure einen inhibierenden Einfluss auf die Katalase und die Ascorbat-Peroxidase besitzt und somit in die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten involviert

ist (Chen et al., 1993; Chamnongpol et al., 1996; Durner und Klessig, 1996; Rao et al., 1997; Takahashi et al., 1997). Ob sich die Synthese von reaktiven Sauerstoffintermediaten direkt auf die Inhibition dieser Enzyme zurückführen lässt, ist umstritten. Es wird vermutet, dass durch die Inhibierung der Katalase und Ascorbat-Peroxidase sekundär Salizylsäureradikale gebildet werden, welche anschließend zur Lipid-Peroxidation führen (Savenkova et al., 1994; Durner und Klessig, 1995; Durner und Klessig, 1996). Neben der Beteiligung an der Synthese von reaktiven Sauerstoffintermediaten besitzt die Salizylsäure auch Bedeutung für die Induktion von PR-Proteinen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Besprühen von *N. tabacum* Blättern mit Salizylsäure zu einer Induktion von PR-1 Proteinen führte. Die gebildete Menge an PR-1 Protein war dabei direkt proportional zu der in den Blättern enthaltenen Salizylsäuremenge (Yalpani et al., 1991).

Zusätzlich zu der Bedeutung der Salizylsäure in der frühen Phase der Pathogenantwort konnte auch der Einfluss für die Ausbildung der SAR, welche eine lang anhaltende Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen vermittelt, nachgewiesen werden. Durch Gaffney und Kollegen wurde dies 1993 durch die Expression des *nahG* Gens aus *Pseudomonas putida* in *N. tabacum* demonstriert. Dieses Gen codiert für eine Salizylsäure-Hydroxylase, die in der Lage ist, Salizylsäure zu Catechol abzubauen. Die Tabakpflanzen, die das *nahG* Gen enthielten, waren im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen nicht in der Lage, SAR auszubilden (Gaffney et al., 1993). In späteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass *nahG* Gen enthaltene *N. tabacum*- und *A. thaliana*-Pflanzen insgesamt eine höhere Anfälligkeit gegenüber Pathogenen zeigten und auch die Expression von Resistenzgenen gestört war. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von 2,6-Dichloroisonicotinsäure, einem Salizylsäureanalog, wieder aufgehoben werden (Delaney et al., 1994).

Wie genau die Salizylsäure innerhalb der Pathogenantwort wirkt, ist nach wie vor Inhalt zahlreicher Untersuchungen. Die Wirkungsweise der Salizylsäure ist vermutlich außerordentlich komplex und an zahlreiche Signalwege gekoppelt. Sie besitzt einen Einfluss auf die Aktivierung von Proteinkinasen, auf Stickstoffmonooxid regulierte Signalwege, sowie auf die Ionenverteilung der Zelle (Conrath et al., 1997; Zhang und Klessig, 1997; Dangl, 1998; Hausladen und Stamler, 1998; Kawano et al., 1998; Dempsey et al., 1999; Kawano und Muto, 2000; Klessig et al., 2000; Kawano et al., 2004).

Eine lang diskutierte Frage beschäftigte sich mit dem mobilen Signal, welches für die Auslösung der SAR in nicht infiziertem Gewebe verantwortlich ist. Untersuchungen haben bestätigt, dass sowohl Salizylsäure wie auch Methylsalizylat in der Lage war, SAR zu induzieren (Malamy et al., 1990; Yalpani et al., 1991; Shulaev et al., 1995; Shulaev et al.,

1997; Seskar et al., 1998). Des Weiteren konnte Salizylsäure im Phloem von Tabak und Gurken nachgewiesen werden, was ein Indiz für den Transport der Salizylsäure vom infizierten- zum nicht infizierten Gewebe darstellt. (Métraux et al., 1990; Rasmussen et al., 1991; Yalpani et al., 1991). Die Isolation eines Salizylsäurebindenden Proteins (SABP2), bei dem es sich um eine Methylsalizylat-Esterase handelt, sowie Pfropfungsversuche am Tabak haben jedoch starke Argumente bereitgestellt, dass es sich bei dem mobilen Signal um Methylsalizylat handeln könnte (Kumar und Klessig, 2003; Forouhar et al., 2005; Park et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass die im infizierten Gewebe gebildete Salizylsäure durch SAMTs zu Methylsalizylat umgesetzt wird und dieses anschließend über das Phloem in nicht infiziertes Gewebe gelangt. Dort wird mittels SABP2 wieder Salizylsäure gebildet, die daraufhin entsprechende Antwortreaktionen auslösen kann (Park et al., 2007). Dass Methylsalizylat tatsächlich in großen Mengen im vegetativen Gewebe gebildet wird, konnte durch Infizierung von *N. tabacum* mit dem TMV bewiesen werden (Shulaev et al., 1997; Seskar et al., 1998). Zudem war Methylsalizylat in der Lage, auch in unbefallenen Nachbarpflanzen eine SAR-Antwortreaktion hervorzurufen (Shulaev et al., 1997). Ein weiteres Argument für diese Theorie stellt die Erkenntnis dar, dass *N. tabacum*, der nicht in der Lage war das SABP2 zu exprimieren, keine SAR induzieren konnte (Kumar und Klessig, 2003).

Inwieweit die strukturell sehr ähnlichen Verbindungen Benzoesäure und Methylbenzoat ebenfalls einen Einfluss bei der Pathogenabwehr der Pflanzen besitzen, ist noch unklar. Neuste Untersuchungen haben gezeigt, dass Methylbenzoat einen inhibierenden Einfluss auf das Wurzelwachstum von *A. thaliana* ausübt (Horiuchi et al., 2007). Zudem konnten Mikroarray Analysen zeigen, dass sich durch Methylbenzoat-Behandlung die Expression von insgesamt 375 Genen (ca. 1,33 % des gesamten *A. thaliana*-Genoms) veränderte. Hierbei handelte es sich allerdings nicht um Gene, die in der Pathogenabwehr von Bedeutung sind, sondern vorwiegend um Gene, die ihre Funktion im Hormonhaushalt von *A. thaliana* besitzen (Horiuchi et al., 2007). Die Bedeutung der Benzoesäure bei der Pathogenabwehr wird bisher vor allem darin gesehen, dass sie eine mögliche Vorstufe bei der Synthese der Salizylsäure darstellt (Yalpani et al., 1993; Lee et al., 1995; León et al., 1995). Es muss jedoch erwähnt werden, dass bereits auch Benzoesäure unabhängige Salizylsäure-Synthesewege über Isochorismat bzw. o-Coumarsäure beschrieben wurden (Yalpani et al., 1993; Wildermuth et al., 2001).

1.3.2 Synthese von Benzoessäure und Salizylsäure

Benzoessäure und Salizylsäure stellen die Ausgangsverbindungen für die Synthese von Methylsalizylat und Methylbenzoat durch die SAMTs, BSMTs bzw. BAMTs dar. Die Salizylsäure kann durch Hydroxylierung an ortho-Position direkt aus der Benzoessäure synthetisiert werden (León et al., 1993; León et al., 1995). Zusätzlich zum Weg über Benzoessäure sind aber auch mehrere Benzoessäure unabhängige Wege für die Bildung von Salizylsäure beschrieben worden. Die Synthese der Benzoessäure erfolgt in Pflanzen vermutlich aus Benzaldehyd, Benzoyl-CoA, Benzoyl-Glucose oder Benzylbenzoat (Boatright et al., 2004).

Aromatische Verbindungen werden in Pflanzen ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat über den Shikimatweg synthetisiert (Hermann und Weaver, 1999). Eine wichtige Verzweigungsstelle innerhalb dieses Weges findet sich am Chorismat, welches ein gemeinsames Intermediat für die Synthese unterschiedlicher Verbindungen darstellt. Ausgehend vom Chorismat sind zwei Hauptwege für die Synthese von Salizylsäure beschrieben (Lee et al., 1995; Wildermuth et al., 2001).

Der erste Weg verläuft über Phenylalanin. Durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) wird aus Phenylalanin *trans*-Zimtsäure synthetisiert. Die *trans*-Zimtsäure kann nun unter Bildung von *o*-Coumarsäure hydroxyliert und diese daraufhin zu Salizylsäure umgesetzt werden (Yalpani et al., 1993; Sticher et al., 1997). Die Bildung von Salizylsäure kann alternativ dazu aber auch durch die Verkürzung der Seitenkette von Zimtsäure zu Benzoessäure, mit einer anschließenden Hydroxylierung an ortho-Position erfolgen (Yalpani et al., 1993; Meuwly et al., 1995). Die Hydroxylierung der Benzoessäure wird in *N. tabacum* durch die Benzoessäure-2-Hydroxylase katalysiert, bei der es sich um eine lösliche Cytochrom-P₄₅₀-Monooxygenase handelt (León et al., 1993; León et al., 1995).

Für die Verkürzung der Seitenketten von Zimtsäure bzw. *o*-Coumarsäure sind ein CoA-abhängiger oxidativer Weg, ähnlich der β -Oxidation von Fettsäuren, und ein CoA-unabhängiger nicht oxidativer Weg beschrieben worden (Schnitzler et al., 1992; Löscher und Heide, 1994).

Neben dem Weg über *o*-Coumarsäure bzw. Benzoessäure wurde ein dritter Weg, ausgehend von *trans*-Zimtsäure, postuliert. Hierbei wird vermutet, dass Benzoessäure und Salizylsäure über Benzoyl-Glucose gebildet werden könnten (Chong et al., 2001).

Der zweite Hauptweg, über den nur Salizylsäure und keine Benzoessäure synthetisiert werden kann, ist unabhängig von Phenylalanin und verläuft über Isochorismat (Wildermuth et al.,

2001). Hierbei handelt es sich um einen Weg, der auch von Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, für die Bildung der Salizylsäure genutzt wird (Serino et al., 1995). Für die Salizylsäuresynthese sind zwei Enzyme notwendig. Durch die Isochorismat-Synthase wird aus Chorismat Isochorismat gebildet, welches anschließend durch die Pyruvat-Lyase zu Salizylsäure umgesetzt wird.

Innerhalb des Genoms von *A. thaliana* konnten zwei Isochorismat-Synthasen (ICS1 und ICS2) identifiziert werden. Untersuchungen konnten zeigen, dass nach Befall mit dem Pilz *Erysiphe orontii* oder dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ICS1 in Blättern von *A. thaliana* exprimiert wurde. Es wurde nachgewiesen, dass die Expression der ICS1 mit der Akkumulation von Salizylsäure und der Synthese von PR-1 Proteinen gekoppelt war. Im Gegenzug wurde von *A. thaliana* *sid2-2* Mutanten, die aufgrund einer Deletion keine intakte ICS1 mehr synthetisieren konnten, nur noch geringe Mengen an Salizylsäure synthetisiert (Wildermuth et al., 2001). Die Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass es in *A. thaliana* ebenso wie bei vielen Mikroorganismen einen von Phenylalanin unabhängigen Syntheseweg für Salizylsäure geben muss.

Inwieweit die eben beschriebenen Synthesewege für Pflanzen tatsächlich zutreffend sind und welche Gewichtung sie bei der Synthese von Benzoesäure und Salizylsäure spielen, ist aufgrund fehlender Informationen über viele der potentiellen Enzyme immer noch schwer zu beurteilen. Es wird jedoch vermutet, dass sie in Pflanzen nebeneinander vorkommen und vermutlich miteinander in Verbindung stehen könnten (Wildermuth et al., 2001; Boatright et al., 2004).

1.4 Salizylsäure- und Benzoesäure-Carboxyl-Methyltransferasen und der Blütenduft

Salizylsäure- und Benzoesäure-Carboxyl-Methyltransferasen konnten bereits aus Blüten und Blättern verschiedener Pflanzen isoliert- und teilweise charakterisiert werden (Tab.1.1). Die Mehrzahl der charakterisierten Enzyme findet sich in Blüten, wo sie die oft im Blütenduft vieler Pflanzen enthaltenen Verbindungen Methylsalizylat und Methylbenzoat synthetisieren. Mittels Immunolokalisation konnte der genaue Aufenthaltsort der BAMT von *Antirrhinum majus*, der BSMT von *Nicotiana suaveolens* und der SAMT von *Stephanotis floribunda* in den Blüten bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass diese Enzyme vor allen in den Petalen, und dort vorwiegend in den äußeren epidermalen Bereichen, lokalisiert sind (Kolossova et al., 2001a; Rohrbeck et al., 2006).

Innerhalb der Solanaceae ist die Emission von Methylsalizylat und Methylbenzoat im Blütenduft auf wenige Arten beschränkt (Raguso et al., 2003a; Raguso et al., 2003b, Raguso et al., 2006; Martins et al., 2007). So konnten diese Verbindungen beispielsweise im Blütenduft von *Datura wrightii* bzw. *Cestrum nocturnum* nachgewiesen werden, während sie bei ihren nahen Verwandten *Datura innoxia* bzw. *Cestrum elegans* nicht gefunden wurden (Martins et al., 2007). Dieses Phänomen wurde auch in der Gattung *Nicotiana* beobachtet. Die australischen Arten *N. suaveolens* und *N. cavicola* synthetisieren sowohl Methylsalizylat wie auch Methylbenzoat, wobei in den süd-amerikanischen Arten diese Verbindungen nicht, oder wie in *N. alata* und *N. sylvestris* nur in Spuren, nachgewiesen werden konnten (Raguso et al., 2003a, Raguso et al., 2006). Mittlerweile ist es gelungen, das für die Synthese von Methylbenzoat und Methylsalizylat verantwortliche Enzym aus *N. suaveolens*, welches hier als N.sua.BSMT1-1 bezeichnet wird, aus Blüten zu isolieren und zu charakterisieren (Pott et al., 2004). Dieses Enzym, das einen typischen Vertreter der SABATH-Methyltransferase Familie darstellt, hat eine Länge von 355 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 39,9 kDa. Es kann sowohl Benzoesäure wie auch Salizylsäure mit vergleichbaren Km-Werten als Substrat umsetzen, wobei es eine höhere katalytische Aktivität mit Benzoesäure zeigt (Pott et al., 2004). Somit wurde es der Gruppe der BAMT-Typen zugerechnet (Effmert et al., 2005). Die N.sua.BSMT1-1 zeigt eine nocturnal circadiane Regulation, was mit der Bestäubung der Blüten von *N. suaveolens* durch Nachtfalter korreliert (Saschenbrecker, 2003; Pott et al., 2004).

Tabelle 1.1: Übersicht über die bereits isolierten und teilweise beschriebenen Salizylsäure- und Benzoesäure-Carboxyl-Methyltransferasen der SABATH-Familie.

Enzym-Typ	Enzym-Bezeichnung	Ursprungsorganismus	Expression	Referenz
BAMT-Typ	N.sua.BSMT1-1	<i>Nicotiana suaveolens</i>	Blüten	Pott et al., 2004
	A.t.BSMT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Blätter/ Blüten	Chen et al., 2003
	A.l.BSMT1	<i>Arabidopsis lyrata</i>	Blätter/Blüten	Chen et al., 2003
	A.m.BAMT	<i>Antirrhinum majus</i>	Blüten	Murfitt et al., 2000
	O.s.BSMT1	<i>Oryza sativa</i>	Blätter	Koo et al., 2007
SAMT-Typ	C.b.SAMT	<i>Clarkia breweri</i>	Blüten	Ross et al., 1999
	A.m.SAMT	<i>Antirrhinum majus</i>	Blüten	Negre et al., 2002
	H.c.SAMT	<i>Hoya carnosa</i>	Blüten	Pott, 2003
	S.f.SAMT	<i>Stephanotis floribunda</i>	Blüten	Pott et al., 2004
	P.h.BSMT1	<i>Petunia hybrida</i>	Blüten	Negre et al., 2003
	P.h.BSMT2	<i>Petunia hybrida</i>	Blüten	Negre et al., 2003
	D.w.SAMT	<i>Datura wrightii</i>	Blüten	Krohn, 2007
	C.n.SAMT	<i>Cestrum nocturnum</i>	Blüten	Krohn, 2007
	A.b.SAMT	<i>Atropa belladonna</i>	Wurzelhaare	Fukami et al., 2002
O.s.BISAMT1	<i>Oryza sativa</i>	unbekannt	Xu et al., 2006	

1.5 Zielstellung der Doktorarbeit

Mit einer Vielzahl von Studien konnte bereits die Bedeutung von Methylsalizylat in der Pathogenabwehr und in der Anlockung von potentiellen Bestäubern nachgewiesen werden. Ob Methylsalizylat in der Pathogenabwehr jedoch nur als mobiles Signal für die Auslösung der SAR dient, oder ob es auch einen direkten Einfluss auf die Expression von Genen besitzt, ist noch immer unklar.

Für Methylbenzoat wurde vor allem ein Einfluss bei der Bestäubung gezeigt, wobei durch neuere Untersuchungen auch eine Wirkung auf die Genexpression bei *A. thaliana* deutlich wurde.

Nach wie vor gibt es jedoch eine Vielzahl an offenen Fragen. So ist noch unklar, wie die blütenspezifischen Methylsalizylat- und Methylbenzoat synthetisierenden Enzyme entstanden sind und ob ihr Ursprung in den für die Pathogenabwehr wichtigen SAMTs liegt. Vergleiche der Identitäten zwischen den aus verschiedenen Solanaceae isolierten Carboxyl-Methyltransferasen, wie der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1, der blütenspezifischen P.h.BSMT1 und P.h.BSMT2 aus *Petunia hybrida* und der aus Wurzeln isolierten A.b.SAMT aus *Atropa belladonna* zeigen, dass die A.b.SAMT, die P.h.BSMT1 und die P.h.BSMT2 Identitäten von 84 % - 88 % zueinander besitzen, wohingegen die Identität dieser Enzyme zu der N.sua.BSMT1-1 nur 61 % - 64 % beträgt (Effmert et al., 2005). Weiterhin weichen die Aminosäuren des aktiven Zentrums der N.sua.BSMT1-1 deutlich von diesen drei Enzymen ab. Die N.sua.BSMT1-1 weist im Gegensatz zu der A.b.SAMT, der P.h.BSMT1 und der P.h.BSMT2 eine viel höhere katalytische Aktivität mit Benzoesäure als mit Salizylsäure auf, weshalb sie den BSMT-Typen zugerechnet wurde (Effmert et al., 2005). Neben diesen Unterschieden fällt überdies die geringe Substratspezifität der N.sua.BSMT1-1 ins Auge. Sie zeigt neben der Aktivität mit Benzoesäure und Salizylsäure noch hohe Aktivitäten mit einer Vielzahl weiterer Verbindungen wie 4-Hydroxy-Benzoesäure, Zimtsäure, Anthranilsäure, o-Anissäure (2-Methoxy-Benzoesäure) und Jasmonsäure. Diese geringe Substratspezifität würde dafür sprechen, dass die N.sua.BSMT1-1 evolutionär betrachtet ein recht junges Enzym sein könnte.

All diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass es neben den für die Pathogenabwehr bedeutsamen SAMTs, noch BSMT-ähnliche Sequenzen in verschiedenen *Nicotiana*-Arten geben könnte. Es wäre denkbar, dass diese Sequenzen für Enzyme kodieren, die nicht Salizylsäure als bevorzugtes Substrat methylieren und dass sie den Ursprung der blütenspezifische N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* darstellen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit nach SAMT-ähnlichen und BSMT-ähnlichen Sequenzen in *N. suaveolens*, *N. alata* und *N. sylvestris* gesucht werden. Für alle Arten konnte im Blütenduft Methylsalizylat bzw. Methylbenzoat nachgewiesen werden. Jedoch ist die in *N. alata* und *N. sylvestris* gebildete Menge außerordentlich gering (Raguso et al., 2003a). Anschließend sollte geklärt werden, welche der gefundenen Gene exprimiert werden. Zudem war es notwendig, die codierenden Sequenzen zu vervollständigen, um die Enzyme anschließend überexprimieren zu können. Untersuchungen der Substratspezifität sollten Aufschluss über die bevorzugten Substrate liefern. Zu guter Letzt sollten Untersuchungen des Expressionsmusters der Gene durchgeführt werden, um erste Vermutungen über Funktion der Enzyme in den Pflanzen zu ermöglichen.

1.6 Verwendete Pflanzen

1.6.1 *Nicotiana suaveolens* Lehm.

N. suaveolens gehört zur Familie der Solanaceae. Bei *N. suaveolens* handelt es sich um eine einjährige Rosetten bildende krautige Pflanze. Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet liegt in Australien, mit größeren Vorkommen um Sydney und Melbourne. *N. suaveolens* bildet weiße Blüten, die aus fünf verwachsenen Sepalen, fünf zu einer Kronröhre verschmolzenen Petalen, sowie fünf Staubblättern und einem oberständigem Gynoeceum bestehen. *N. suaveolens* gehört zu den nocturnal emittierenden Pflanzen, wobei in Blüten 31 verschiedene Verbindungen identifiziert werden konnten (Raguso et al., 2003a). Eine Hauptkomponente des Blütenduftes ist Methylbenzoat. Weiterhin ließen sich auch Methylsalizylat, Benzylbenzoat, Benzylsalizylat, Benzylalkohol sowie Terpene wie Limonen, Myrcen, 1,8-Cineol und Sabinen nachweisen (Loughrin et al., 1990a; Loughrin et al., 1991; Raguso et al., 2003a). *N. suaveolens* besitzt 16 Chromosomenpaare (Goodspeed, 1954).

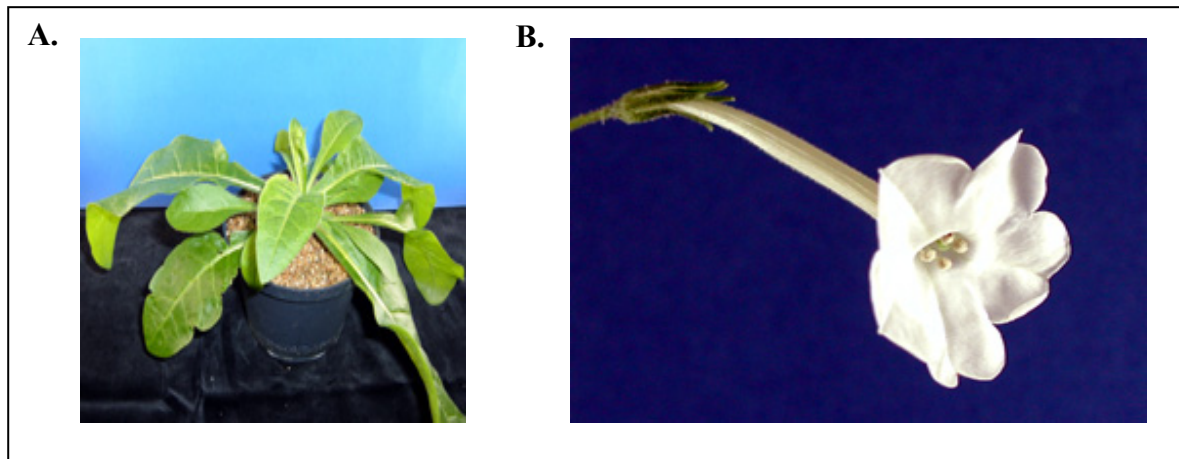


Abbildung 1.2: *Nicotiana suaveolens*

A: Foto einer ca. 8 Wochen alte Pflanze; **B:** Blüte von *N. suaveolens*

1.6.2 *Nicotiana alata* Link & Otto:

Bei *N. alata* handelt es sich um eine Staude, die Höhen von 1 bis 1,5 m erreichen kann. Sie gehört zur Familie der Solanaceae und das Verbreitungsgebiet befindet sich in Uruguay, S.-O.-Brasilien, Argentinien und Paraguay. Im Blütenduft von *N. alata* konnten 65 verschiedene Verbindungen identifiziert werden (Raguso et al., 2003a). *N. alata* besitzt 9 Chromosomenpaare (Goodspeed, 1954).

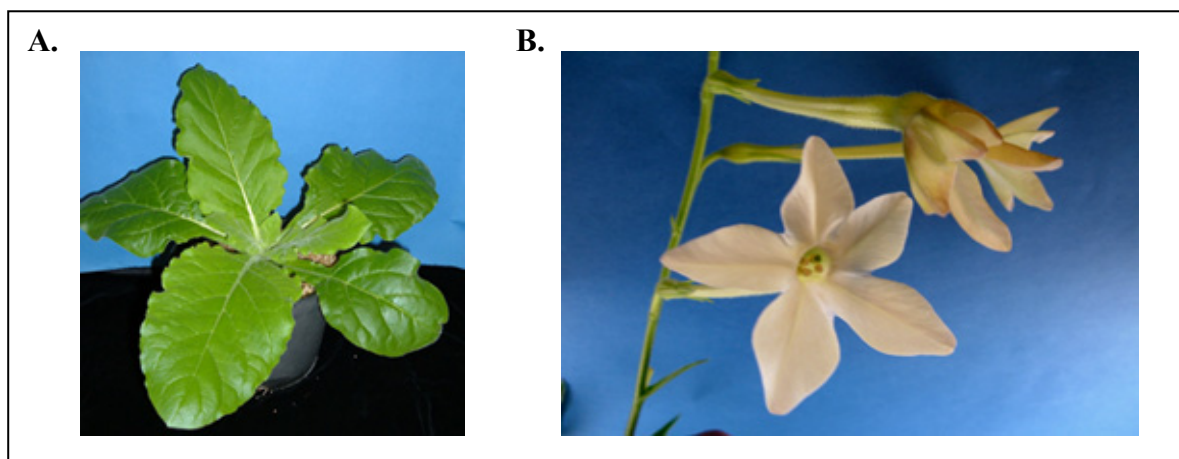


Abbildung 1.3: *Nicotiana alata*

A: Foto einer ca. 8 Wochen alte Pflanze; **B:** Blüte von *N. alata*

1.6.3 *Nicotiana sylvestris* Speg. & Comes

N. sylvestris gehört zur Familie der Solanaceae. Diese 1 bis 2 m groß werdende Staude wächst in Bolivien und N.-W.-Argentinien. Die weißen zur Selbstbefruchtung fähigen Blüten duften nur relativ schwach. Im Blütenduft konnten 13 verschiedene Verbindungen

identifiziert werden (Raguso et al., 2003a). *N. sylvestris* besitzt 12 Chromosomenpaare. Sie wird neben *N. otophora* und *N. tomentosiformis* als Vorfahre von *N. tabacum* gesehen (Goodspeed, 1954; Riechers et al., 1999).

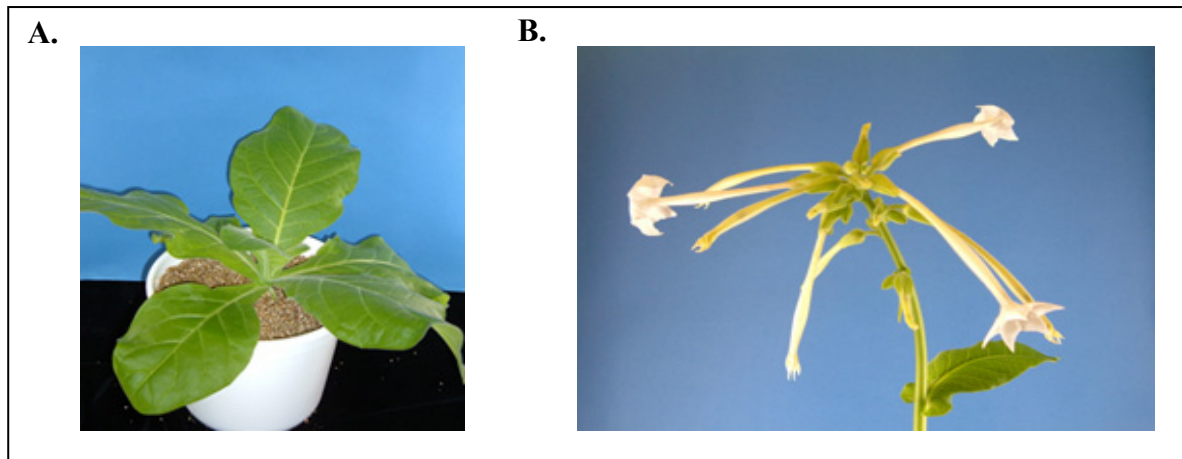


Abbildung 1.4: *Nicotiana sylvestris*

A: Foto einer ca. 8 Wochen alte Pflanze; **B:** Blüte von *N. sylvestris*.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Für sämtliche Versuche wurden Chemikalien des Reinheitsgrades p.a. und höher verwendet. Sie wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Sigma (Steinheim), Fluka (Buchs), Gibco BRL (Karlsruhe), Difco (Detroit), Merck (Darmstadt) und Duchefa (Haarlem) bezogen. Das radioaktive ^{14}C -SAM stammte von der Firma Hartmann Analytik GmbH (Braunschweig).

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus der Reinstwasseranlage Clear-UV plus (Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH; Hamburg-Barsbüttel) angesetzt und anschließend autoklaviert. Lösungen, bei denen kein Autoklavieren möglich war, wurden unter Verwendung eines Sterilfilters mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ steril filtriert.

2.1.2 Molekularbiologische Verbrauchsmaterialien

Die für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Hybaid (Ulm), Fermentas (St. Leon-Rot), MWG Biotech (Ebersberg), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim), Stratagene (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Qiagen (Hilden), Millipore (Molsheim), Sarstedt AG (Nümbrecht), Perkin Elmer (Groningen), Bio-RAD (München), Biozym Scientific GmbH (Oldendorf).

Die im Einzelnen verwendeten Enzyme und Kits werden jeweils separat bei den entsprechenden Versuchen genannt.

2.1.3 Bakterienstämme (*E. coli*)

DH5 α	<i>endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 ΔlacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ 15) (Hanahan, 1983)
XL1blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻</i> F' [<i>proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10 (tet^r)</i>] (Bullock et al., 1987)
Top10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74recA1</i> <i>deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1</i> <i>nupG</i> (Invitrogen)
HMS174(DE3)	F ⁻ <i>recA</i> (r ⁻ K12 m ⁺ K12) <i>rif^r</i> (DE3)
BL21 TM (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal dcm rne131</i> (DE3) (Invitrogen)
One Shot® Mach1 TM -T1R	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (rK ⁻ mK ⁺) Δ <i>recA1398 endA1</i> <i>tonA</i>

2.1.4 Plasmide

pGEM-T	Vektor zur Klonierung von PCR Produkten (Promega)
pBluescript II SK ⁻	Dieser Vektor wurde linearisiert und nach anschließender Addition eines 3'-Thymidin-Überhangs zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. (Ursprungsvektor von Stratagene)
pET101/D-TOPO	Vektor zur IPTG- induzierten Überexpression von heterologen Proteinen in DE3- <i>E. coli</i> Stämmen (Invitrogen)
pET SUMO	Vektor zur IPTG- induzierten Überexpression von heterologen Proteinen in DE3- <i>E. coli</i> Stämmen (Invitrogen)
pSBET-b	Vektor mit Gen für <i>argU</i> Gen (Schenk et al., 1995)

2.1.5 Oligonukleotidsequenzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Biomers.net GmbH (Ulm) sowie Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Primersequenzen sind im Anhang (Tab. 6.2) aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Pflanzen und Pflanzenanzucht

<i>Nicotiana suaveolens</i> Lehm.	Anzucht aus Samen, Eigenbestand
<i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes	Anzucht aus Samen von R. A. Raguso (University of South Carolina)
<i>Nicotiana alata</i> Link & Otto	Anzucht aus Samen von R. A. Raguso (University of South Carolina)

Die Pflanzen wurden auf Vermiculite (Deutsche Vermiculite-Dämmstoff GmbH) unter Langtagbedingungen mit 16 h Licht ($160 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) bei 22 °C und 8 h Dunkelheit bei 18 °C in Klimakammern kultiviert. Die Nährstoffversorgung erfolgte mittels Hoagland-Nährlösung.

Hoagland-Nährlösung:

KNO ₃	(1 M)	150 ml
Ca(NO ₃) ₂	(0,3 M)	333 ml
KH ₂ PO ₄	(60 mM)	250 ml
MgSO ₄	(0,2 M)	500 ml
Spurenelemente		30 ml
FeNa-EDTA Lösung		30 ml
H ₂ O	ad	50 l

Spurenelemente:

H ₃ BO ₃		2,86 g
MnCl ₂ x2H ₂ O		1,5 g
CuSO ₄ x5H ₂ O		80 mg
ZnSO ₄ x7H ₂ O		220 mg
NaMoO ₄ x2H ₂ O		29 mg
H ₂ O	ad	1 l

FeNa-EDTA Lösung, pH 8:

FeCl ₃ x6H ₂ O		35,9 g
Na-EDTA		17 g
H ₂ O	ad	1 l

2.2.2 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte unter Nutzung des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), des Nucleo Spin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel) nach den Angaben der Hersteller bzw. einer modifizierten Methode von Chang et al. (1993).

2.2.2.1 Gesamt-RNA Extraktion nach Chang et al. (1993); modifiziert

Für die Extraktion wurden 2–3 g zuvor schockgefrorenes und bei –70 °C gelagertes Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit 15 ml auf 65 °C vorgewärmten CTAB-Extraktionspuffer und 450 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Der Extrakt wurde in 50 ml Sarstedt-Röhrchen überführt und 5 min bei 65 °C inkubiert, um eine zusätzliche Lysierung der Zellen zu erreichen. Nach dem Ausschütteln der Proben mit 15 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei RT und 6500 rpm. Die obere Phase wurde mit einer Glaspipette vorsichtig abgenommen, in ein weiteres Sarstedt-Röhrchen überführt und erneut mit 15 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und zentrifugiert. Für die Fällung der RNA wurde die obere Phase anschließend mit ¼ Volumen 10 M Lithiumchlorid versetzt und über Nacht auf Eis gefällt. Am folgenden Tag wurde die Lithiumchloridlösung bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 700 µl 60 °C warmen SSTE-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine zweimalige Extraktion mit 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), der jeweils ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 rpm folgte. Für die Fällung der RNA wurde der Überstand mit 2 Volumen 99,8 %igem Ethanol versetzt und zwei Stunden bei –70 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation von 30 min bei 14500 rpm und 4 °C, wodurch die RNA pelletiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die RNA wurde je nach Größe des Pellets in 30–100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –70 °C gelagert.

CTAB-Extraktionspuffer: 2,0 % CTAB; 2 % PVP K40; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 25 mM EDTA; 2 M NaCl

SSTE-Puffer: 1 M NaCl; 0,5 % SDS; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

Chloroform: Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)

Lithiumchlorid: 10 M

2.2.3 Isolation von DNA nach Khanuja et al. (1999)

Für die DNA Isolation wurden etwa 3 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und nach Zugabe von 3 ml Extraktionspuffer für eine Stunde bei 60 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die Probe wurde im Anschluss mit 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und nach 15-minütigem Schütteln bei 8000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Daraufhin wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit 1,5 ml 5 M NaCl sowie 0,6 Volumen Isopropanol versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 10000 rpm, bei dem die DNA pelletiert wurde. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl Hochsalz TE-Puffer aufgenommen. Vorhandene RNA-Reste wurden durch Zugabe von 5 µl RNase A und einer anschließenden 30-minütigen Inkubation bei RT entfernt. Die Inaktivierung und Entfernung der RNase A aus der Probe erfolgte durch Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), mit anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm bei RT. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die DNA mit 2 Volumen 99,8 %igem Ethanol durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm bei RT gefällt, mit 80 %igem Ethanol gewaschen und das erhaltene Pellet nach dem Trocknen in 50–200 µl Wasser aufgenommen.

Extraktionspuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 25 mM EDTA; 1,5 M NaCl;
2,5 % CTAB; 0,2 % β-Mercaptoethanol (v/v); 1 % PVP (w/v)

Hochsalz TE-Puffer: 1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

NaCl-Lösung: 5,0 M

Chloroform/Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)

RNase A: 10 mg/ml Stammlösung

2.2.4 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmiden erfolgte mittels QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen). Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte durch Doppelansätze mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Smart SpecTM3000, BIO RAD). Die Messungen wurde in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt, in der eine Lösung doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml bzw. RNA von 40 µg/ml einen Absorptionswert (Optische Dichte, OD) von 1 aufweist. Die Bestimmung der Reinheit der untersuchten Nukleinsäuren ließ sich aus dem Quotienten der gemessenen Optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ermitteln. Eine reine RNA-Lösung besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀ –Wert von 2,0, eine reine DNA-Lösung von 1,8. Bei Verschmutzungen durch Proteine ist dieser Wert signifikant kleiner.

2.2.6 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren anhand ihrer Größe erfolgte mittels Agarose Gelelektrophorese. Hierbei wurden denaturierende Agarosegele für die Auftrennung von RNA und nichtdenaturierende Agarosegele für die Auftrennung von DNA eingesetzt.

2.2.6.1 Agarose Gelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten durch horizontale Gelelektrophorese wurden je nach Bedarf 0,8–1,5 %ige Agarosegele (w/v) verwendet. Der in 1 x TAE-Puffer aufgekochten Agarose wurden nach kurzer Abkühlung 0,005 % (v/v) Ethidiumbromid zugegeben. Dabei handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, welcher die Visualisierung der DNA unter UV-Licht einer Wellenlänge von 254–366 nm ermöglicht (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Farbmix vermischt, auf das mit 1 x TAE Puffer überschichtete Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 60–80 V aufgetrennt.

50 x TAE-Puffer:	2 M Tris; 50 mM EDTA; 1 M Eisessig
Roti [®] -Load DNA (Roth):	240 mM Tris-Acetat (pH 8,2); 6 mM EDTA; 0,12 % (w/v) Bromphenolblau; 40 % Saccharose
Ethidiumbromid- Stammlösung:	(5 mg/ml)
Agarosegel:	0,8–1,5 % (w/v) Agarose (Duchefa); 0,005 % (v/v) Ethidium- bromid (Stammlösung 5 mg/ml); 1 x TAE-Puffer

2.2.6.2 Denaturierende Agarose Gelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA erfolgte mittels 1 %iger denaturierender Agarosegele. Sie diente in erster Linie der Überprüfung von Intaktheit und Reinheit der RNA. Die Proben wurden mit 2 Volumen Farbmix versetzt, 15 min bei 65 °C inkubiert und nach 2-minütigem Abkühlen auf Eis auf das Gel aufgetragen. Nach einer Elektrophorese bei 70 V in 1 x RB-Puffer erfolgte der Nachweis der RNA durch Anregung des im Farbmix enthaltenen Ethidiumbromids unter UV-Licht (Geldokumentationsanlage, MWG-Biotech).

10 x RB-Puffer:	200 mM MOPS (pH 7,0); 50 mM Na-Acetat; 5 mM EDTA
RNA-Farbmix:	6 % (v/v) 10x RB-Puffer; 22 % (v/v) Formaldehyd; 60 % (v/v) Formamid; 12 % (v/v) DNA-Farbmix (Roth); 1 % (v/v) Ethidiumbromid-Stammlösung (5 mg/ml)
Agarosegel:	1 % (w/v) Agarose (Duchefa); 1x RB-Puffer; 0,4 M Formaldehyd

2.2.7 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA wurden die Banden erwarteter Größe auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mittels QIAquick Gel-Extractions-Kit (Qiagen) nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben.

2.2.8 Herstellung eines Vektors mit 3' T-Überhang

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit sehr häufig durchgeführten Ligation von PCR Produkten stellte es sich als sinnvoll heraus, einen Vektor zu konstruieren, der sich neben den käuflich erwerbbaaren pGEM-T Vektor (Promega) standardmäßig für Ligationen einsetzen ließ. Zu diesem Zweck wurde der pBluescript II SK⁻ (Stratagene) verwendet. Die Linearisierung des Plasmids erfolgte durch *EcoRV*:

Restriktionsverdau von pBluescript II SK⁻ mittels *EcoRV*

Plasmid	100 µg	
<i>EcoRV</i> (Fermentas)	10 µl (100 U Stammlösung)	
Reaktionspuffer R (Fermentas)	6 µl	
ddH ₂ O	ad 60 µl;	Inkubation bei 37 °C über Nacht

Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 65 °C wurde die Reaktion abgestoppt und die Vollständigkeit des Verdauens durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen aufgereinigt. Nach der Aufreinigung erfolgte das Anfügen der für die Ligation von PCR-Produkten benötigten 3'-T-Überhänge.

Anfügen von 3'-T-Überhängen an linearisierte pBluescript II SK⁻ Vektoren

10 x PCR-Puffer (Fermentas)	10 µl
linearisierte pBluescript II SK ⁻	10 µg
MgCL ₂ (Fermentas)	8 µl (Endkonzentration 2 mM)
dTTP (Roth)	20 µl (Stammlösung 5 mM)
Taq-Polymerase (Fermentas)	1 µl (5 U/µl) Inkubation 2 h bei 70 °C

Die linearisierten und mit 3'-T-Überhang versehenen pBluescript II SK⁻ Vektoren wurden mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen aufgereinigt und deren Konzentration photometrisch bestimmt. Von den so präparierten Vektoren wurden 50 ng Aliquots erstellt und diese bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.9 Ligation von DNA in Vektoren

Für die Ligation von PCR-Fragmenten wurde der in 2.2.8 beschriebene pBluescript II SK⁻ Vektor bzw. der pGEM-T Vektor der Firma Promega verwendet. Die Ligation mit dem pGEM-T Vektor der Firma Promega erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Ligationen mit dem pBluescript II SK⁻ Vektor wurden wie folgt durchgeführt:

10 x Ligations Puffer (Fermentas):	1 µl
Vektor:	1 µl (50 ng)
T4 Ligase (Fermentas):	1 µl (1U/µl)
DNA	x µl
ddH ₂ O	ad 10 µl
	Inkubation bei 4 °C über Nacht

Für die Überexpression von Proteinen wurden die Vektoren pET101/D-TOPO des ChampionTM pET Directional TOPO[®] Expression Kit und pET SUMO des ChampionTM pET SUMO Expression Kit der Firma Invitrogen verwendet. Ligationen mit diesen Vektoren erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

2.2.10 Herstellung und Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemokompetenter Zellen wurden 10 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und der Ansatz über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in inkubiert. Ein Milliliter dieser Vorkultur wurden zum Animpfen einer 100 ml Hauptkultur verwendet. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurde die Kultur 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 30 ml kaltem TFB I resuspendiert. Die Lösung wurde 90 min auf Eis gelagert, erneut 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das entstandene Pellet anschließend in 4 ml eisgekühlten TFB II aufgenommen. Die chemokompetenten Zellen wurden als 100 µl Aliquots bei -70 °C gelagert.

TFB I Puffer: 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂ x 2H₂O; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl₂ x 2H₂O; 15 % (v/v) Glycerol; pH 5,8; sterilfiltrieren

TFB II Puffer: 75 mM CaCl₂ x 2H₂O; 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerol; pH 7,0; sterilfiltrieren

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; pH 7; autoklavieren

Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde der benötigte Stamm auf Eis aufgetaut und 3-5 µl einer Ligation bzw. ca. 0,1 µg Plasmid DNA hinzu gegeben. Einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock von 60 s bei 42 °C. Nach einer erneuten ca. 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurden zu den Bakterien 500 µl SOC-Medium hinzu gegeben und der Ansatz bei 37 °C für 60 min mit 200 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden Aliquots des Transformationsansatzes auf LB-Platten, welche die jeweiligen Antibiotika enthielten, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 5 mM KCl; pH 7,0; autoklaviert
nach dem autoklavieren: Zugabe von 20 mM Glucose (sterilfiltriert); 20 mM MgCl₂ (autoklaviert)

LB-Agar: 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl; 1,5 % (w/v) Agar; pH 7,0; autoklaviert; benötigtes Antibiotikum

2.2.11 RT-PCR und PCR

Die PCR stellt eine in der modernen Biologie nicht mehr wegzudenkende Technik dar. Das Prinzip liegt in einer Abfolge von DNA-Denaturierung, Primeranlagerung („Annealing“) und Elongation, die in einer cyclischen Abfolge wiederholt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche PCR-Variationen mit verschiedenen Enzymen und Puffern durchgeführt. Diese werden im Folgenden jeweils bei den entsprechenden Versuchen vorgestellt und erläutert.

Die RT-PCR wird genutzt, um mittels reverser Transkriptase mRNA in cDNA umzuschreiben und diese anschließend mit Hilfe der PCR zu amplifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der RT-PCR zur Isolation und Komplettierung proteinkodierender Sequenzen und zu Expressionsuntersuchungen verwendet. Vor jeder RT-Reaktion wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt, um die Verfälschung der Ergebnisse durch noch vorhandene DNA zu vermeiden (siehe 2.2.11.2.1). Die genaue Vorgehensweise bei RT-PCRs wird im Einzelnen bei den entsprechenden Versuchen vorgestellt.

Sämtliche verwendeten Primersequenzen sind im Anhang (Tab. 6.2) dargestellt.

2.2.11.1 Suche nach potentiellen BSMTs

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits die Sequenz der Methylbenzoat und Methylsalizylat synthetisierende blütenspezifische N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* bekannt. Es sollten nun BSMT-ähnliche Sequenzen in *N. alata* und *N. sylvestris* gesucht werden. Zudem bestand die Frage, ob es noch weitere BSMT-ähnliche Sequenzen in *N. suaveolens* gibt und ob diese exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden PCRs mit unterschiedlichen, von der N.sua.BSMT1-1 abgeleiteten, Primerkombinationen mit genomischer DNA durchgeführt.

Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen in *N. suaveolens*, *N. sylvestris* und *N. alata* auf genomischer Ebene

Für die Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen wurden Primer von der N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* abgeleitet und in verschiedenen Kombinationen miteinander eingesetzt. Zusätzlich zu der *Taq*-Polymerase (Fermentas) fand die TaKaRa-*Taq*-Polymerase (Biomedicals) Verwendung. Diese diente dazu, die aufgrund möglicher enthaltener Introns

sehr langen genomischen Sequenzen effizient zu synthetisieren. Neben der *Taq*-Polymerase und der TaKaRa-*Taq*-Polymerase wurde auch das *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen) für PCRs verwendet.

Die für die Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen verwendeten Primer sind im Anhang zu finden. Für die PCR-Reaktionen wurden folgende Ansätze und Reaktionsbedingungen gewählt:

Standard PCR-Ansatz mittels *Taq*-Polymerase

PCR-Ansatz:

DNA	100 ng-1 µg
10 x Puffer (Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (Fermentas; 25 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM; Roth)	1 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	2 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (Fermentas; 5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

90 s	94 °C	} 35 x
30 s	94 °C	
30 s	50–60 °C	
30–120 s	72 °C	
5 min	72 °C	
∞ min	10 °C	

PCR mittels TaKaRa-*Taq*-Polymerase

PCR-Ansatz:

DNA	<1 µg
10 x Ex <i>Taq</i> Puffer (Biomedicals)	10 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM; Roth)	8 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	2 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	2 µl
MgCl ₂ (Biomedicals; 25 mM)	8 µl
TaKaRa Ex <i>Taq</i> TM (Biomedicals; 5 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 100 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

5 min	95 °C	} 35 x
30 s	95 °C	
8 min	68 °C	
10 min	68 °C	
∞ min	10 °C	

PCR-Ansatz mittels Master Mix (Qiagen)

PCR-Ansatz:

DNA	100 ng-1 µg
Master Mix (Qiagen)	25 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	1 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

90 s	94 °C	} 35 x
30 s	94 °C	
30 s	50–60 °C	
30–120 s	72 °C	
5 min	72 °C	

Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen in *N. sylvestris*, *N. tomentosiformis* und *N. alata* mittels RT-PCR

Wie jüngste Ergebnisse zeigten, existieren in *N. tabacum* zwei unterschiedliche BSMT-Sequenzen, die sich deutlich voneinander unterscheiden lassen (Park et al., 2007; Barkman, unveröffentlicht). Eine dieser Sequenzen (N.t.SAMT1) hat Ähnlichkeit zu der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens*. Die zweite Sequenz (N.tab.BSMT2-1) zeigt eine höhere Identität zu den im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT2-Sequenzen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde versucht, mehr über den evolutionären Ursprung dieser beiden Sequenzen zu erfahren. Die Suche der BSMT-Sequenzen erfolgte mittels RT-PCR. Die Arbeiten wurden im Rahmen eines Aufenthalts an der Western Michigan University, in der Arbeitsgruppe von Todd Barkman, durchgeführt.

Neben *N. alata* und *N. sylvestris* wurde noch *N. tomentosiformis* auf das Vorhandensein von BSMT-Sequenzen untersucht, da er neben *N. sylvestris* als zweites potentielltes Elternteil von *N. tabacum* gilt. Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob die beiden unterschiedlichen BSMT-Sequenzen in *N. tabacum* (N.tab.BSMT2-1; N.t.SAMT1) das Ergebnis eines Hybridisierungsereignisses sind oder ob sie sich auf eine Genduplikation zurückführen lassen. Die Untersuchungen wurden mit dem SuperscriptTMIII One-Step RT-PCR System with Platinum[®]Taq DNA Polymerase (Invitrogen) nach folgendem Muster durchgeführt:

RT-PCR-Ansatz:

RNA	1 µl
2 x Puffer	12,5 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	1 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	1 µl
RT/Taq	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

RT-PCR-Reaktionsbedingungen:

30 min	50 °C	} 40 x
2 min	94 °C	
30 s	94 °C	
30 s	50 °C	
45 s	72 °C	
5 min	72 °C	

2.2.11.2 Identifizierung von 5'UTR-Bereichen

Durch die Suche von BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene konnten bei *N. suaveolens*, *N. alata* und *N. sylvestris* Teile potentieller Gene mit einer hohen Ähnlichkeit zur blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* erhalten werden. Des Weiteren wurden Teile potentieller SAMTs aus *N. sylvestris* (N.syl.SAMT1) und *N. alata* (N.ala.SAMT1) von Todd Barkman (Western Michigan University) zur Verfügung gestellt. Eine entsprechende SAMT-Sequenz konnte daraufhin mittels RT-PCR zusätzlich aus

N. suaveolens isoliert werden (N.sua.SAMT1). Da die gefundenen Sequenzen nicht den gesamten codierenden Bereich umfassten, mussten sie komplettiert werden.

Für die Identifizierung der 5'UTR-Bereiche der isolierten Teilsequenzen kamen zwei unterschiedliche Strategien zur Anwendung. Zum einen wurde versucht die Sequenzen der 5'UTR-Bereiche mittels 5'RACE zu ermitteln, zum anderen wurden Primer aus dem 5'UTR-Bereich der SAMT aus *N. tabacum* (N.tab.SAMT1) abgeleitet und für die RT-PCR eingesetzt.

Da sich die Ansätze für die 5'RACE bzw. RT-PCR mit abgeleiteten Primern für die einzelnen Sequenzen oft unterschieden, werden sie im Folgenden gesondert aufgeführt. Um noch vorhandene genomische DNA zu entfernen, ging jeder RT-Reaktion ein DNase I-Verdau voraus.

2.2.11.2.1 DNase I-Verdau

Der DNase I-Verdau wurde durchschnittlich 30–60 min bei 37 °C nach folgendem Muster durchgeführt:

RNA	x µl
10 x Puffer (Fermentas)	2 µl
DNase I (Fermentas; 1 U/µl)	2 µl
DTT (Invitrogen; 0,1 M)	1 µl
RNase-Inhibitor (Fermentas; 40 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O (RNase frei)	ad 20 µl

Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 2 µl EDTA (Fermentas; 25 mM) und einer 10-minütigen Inkubation bei 70 °C abgestoppt.

2.2.11.2.2 Identifizierung von 5'UTR-Bereichen mittels RT-PCR

Da die 5'RACE bei den potentiellen SAMT-Sequenzen anfänglich nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurden aus der von Todd Barkman (Western Michigan University) isolierten 5'UTR-Sequenz der N.tab.SAMT1 aus *N. tabacum* (Martins und Barkman, 2005) Primer abgeleitet und diese für RT-PCRs eingesetzt. Um die vorhandene Transkriptmenge der potentiellen SAMTs zu erhöhen, wurden ca. 1 cm großen Blattstücken in 5 mM Salizylsäure für 24 h inkubiert. Der Grund für diese Vorbehandlung lag darin, dass die Induktion von SAMTs durch Zugabe von Salizylsäure bereits in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen wurde

(Malamy et al., 1990; Fukami et al., 2002). Die aus den so behandelten Blattstücken isolierte Gesamt-RNA wurde anschließend für die Untersuchungen eingesetzt.

Für die Identifizierung des 5'UTR-Bereichs wurden 2 µg RNA einem 60-minütigem DNase I-Verdau unterzogen und anschließend eine cDNA Synthese mittels SuperScriptTMIII Reverse Transcriptase (Invitrogen) und eine PCR wie folgt durchgeführt:

RT-Reaktion

DNase I verdaute RNA	11 µl
reverse Primer (10 pmol)	1 µl
	→ Inkubation 5 min 70 °C
5 x Puffer (Invitrogen)	4 µl
dNTP (Roth; je 10 mM)	1 µl
DTT (Invitrogen; 0,1 M)	1 µl
RNase-Inhibitor (Fermentas; 40 U/µl)	1 µl
SuperScript TM III RT (Invitrogen; 200 u/µl)	1 µl
Inkubation	60 min 50 °C
abstoppen der Reaktion	15 min 70 °C

Als Negativkontrolle wurde 1 µl Wasser anstelle der Reversen Transkriptase eingesetzt. Als Primer wurden für die cDNA Synthese N.ala 5'RACE nested (für die N.ala.SAMT1), N.syl 5'RACE nested (für die N.syl.SAMT1) und N.sua 5'RACE (für die N.sua.SAMT1) verwendet.

Für die PCR wurden 5 µl cDNA eingesetzt. Sie erfolgte, wie in 2.2.11.1 für den Standard PCR-Ansatz beschrieben, mit einer „Annealing-Temperatur“ von 54 °C und einer Elongationszeit von 30 s. Als „reverse“ Primer wurden die gleichen Primer eingesetzt, die auch bei der RT-Reaktion verwendet wurden. Als „forward“ Primer kamen N.tab 5'UTR und N.tab 5'UTR2 zum Einsatz. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang (Tab. 6.2) aufgeführt.

2.2.11.2.3 Identifizierung von 5'UTR-Bereichen mittels 5'RACE

Bei der 5'RACE war es notwendig, die mittels RT-Reaktion synthetisierte cDNA an ihrem 3'Ende mit einer zusätzlichen Sequenz zu versehen. Diese Sequenz diente in der nachfolgenden PCR als Primerbindestelle und ermöglichte die Amplifizierung der cDNA inklusive des unbekanntes 5'UTR-Bereichs. Die Verlängerung der cDNA erfolgte durch die terminale Desoxypolynucleotidyl-Transferase (TdT). Um zu gewährleisten, dass nur die cDNA durch die Zugabe von dATP verlängert wurde, mussten zuvor durch einen

Aufreinigungsschritt Primer und überschüssige Nukleotide aus dem RT-Ansatz entfernt werden.

Die hier dargestellte Vorgehensweise war für die BSMT-ähnlichen Sequenzen und die potentiellen SAMTs weitestgehend identisch. Sie unterschieden sich nur in den Punkten, dass bei den potentiellen SAMTs für die RT-Reaktion die SuperScriptTMIII Reverser Transcriptase (Invitrogen) bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C verwendet wurde, wohingegen bei den BSMT-ähnlichen Sequenzen das ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen) zur Anwendung kam. Die RT-Reaktion wurde in diesem Fall bei 54 °C durchgeführt. Weiterhin wurden für die „tailing Reaktion“ bei den potentiellen SAMTs 3 Ansätze mit jeweils 1 µl; 3 µl und 6,5 µl cDNA eingesetzt, wohingegen bei den BSMT-ähnlichen Sequenzen das maximale Volumen von 16,5 µl cDNA eingesetzt wurde.

Jeder RT-Reaktion ging ein 60-minütiger DNase I-Verdau voraus. Die 5'RACE lief unter Berücksichtigung der oben genannten Unterschiede für die BSMT-ähnlichen Sequenzen und die potentiellen SAMTs nach folgenden Muster ab:

RT-Reaktion

Es wurden 4 Parallelansätze erstellt, bei denen jeweils 2 µg RNA eingesetzt wurden. Die Parallelansätze wurden nach der RT-Reaktion vereinigt. Die RT-Reaktion erfolgte für 1 h bei 54 °C mittels des ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen) bzw. 1 h bei 50 °C mittels SuperScriptTM III Reverser Transcriptase (Invitrogen) bei den potentiellen SAMTs, nach den Angaben des Herstellers.

Aufreinigung der cDNA

Die cDNA der Parallelansätze wurde vereinigt und mittels Millipore Montage Kit (Millipore) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Um die Aufreinigung der cDNA zu überprüfen, wurden alle Elutionen für PCRs eingestzt.

Polyadenylierung der cDNA mittels TdT (Invitrogen)

aufgereinigte cDNA	16,5 µl
5 x TdT Puffer (Invitrogen)	5 µl
dATP (Roth; 2 mM)	2,5 µl
	→ Inkubation 2 min, 94 °C
TdT (Invitrogen; 15 U/µl)	1 µl
	→ Inkubation 1 h, 37 °C
	→ Abstoppen 10 min, 65°C

PCR-Ansatz

Die PCRs erfolgten wie für den Standard PCR-Ansatz unter 2.2.11.1 beschrieben. Es wurden jeweils 5 µl der „tailing Reaktion“ für die PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer und Bedingungen sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Übersicht über die für die 5'RACE verwendeten Primer und PCR-Programme.

Pflanze	Sequenz	Primer für RT-Reaktion	Primer für PCR	PCR Bedingungen
<i>N. suaveolens</i>	BSMT-ähnliche Sequenz (N.sua.BSMT2-1)	alaHRO 5'RACE	fw: oligo dT-R2-Mix rev: alaHRO 5'RACE nested bzw. alaHRO 5'RACE	3 min 94 °C; 10 x (35 s 94 °C; 40 s 45 °C; 50 s 72 °C); 30 x (30 s 94 °C; 30 s 50 °C; 50 s 72 °C); 5 min 72 °C
<i>N. alata</i>	potentielle SAMT (N.ala.SAMT1)	N.ala 5'RACE	fw: oligo dT-R2-Mix rev: N.ala 5'RACE nested	2 min 94 °C; 35 x (30 s 94 °C; 1 min 45 °C; 1 min 72 °C); 10 min 72 °C
	BSMT-ähnliche Sequenz (N.ala.BSMT2-1)	alaHRO 5'RACE	fw: oligo dT-R2-Mix rev: alaHRO 5'RACE nested bzw. alaHRO 5'RACE	3 min 94 °C; 10 x (35 s 94 °C; 40 s 45 °C; 50 s 72 °C); 30 x (30 s 94 °C; 30 s 50 °C; 50 s 72 °C); 5 min 72 °C
<i>N. sylvestris</i>	potentielle SAMT (N.syl.SAMT1)	N.syl 5'RACE	fw: oligo dT-R2-Mix rev: N.syl 5'RACE nested	2 min 94 °C; 35 x (30 s 94 °C; 1 min 43 °C; 1 min 72 °C); 10 min 72 °C
	BSMT-ähnliche Sequenz (N.syl.BSMT2-1)	alaHRO 5'RACE	fw: oligo dT-R2-Mix rev: sylHRO 5'RACE nested bzw. alaHRO 5'RACE	3 min 94 °C; 10 x (35 s 94 °C; 40 s 45 °C; 50 s 72 °C); 30 x (30 s 94 °C; 30 s 50 °C; 50 s 72 °C); 5 min 72 °C

2.2.11.3 Identifizierung der 3'UTR-Bereiche

Die Identifizierung der 3'UTR-Bereiche der BSMT-ähnlichen Sequenzen und der potentiellen SAMTs erfolgte ebenfalls über verschiedenen Ansätze. Als ein Weg wurde die 3'RACE gewählt. In den Fällen, bei der die 3'RACE jedoch erfolglos blieb, wurden Primer aus dem 3'UTR-Bereich bereits bekannter ähnlicher Sequenzen abgeleitet und diese für die RT-Reaktion eingesetzt. Bei der 3'RACE war es wichtig, die Reaktionstemperatur zu finden, bei der zum einen Sekundärstrukturen aufgeschmolzen wurde und zum anderen die verwendeten Primer noch effizient an die mRNA banden. Dies wurde durch die Verwendung hitzestabiler reverser Transkriptasen erreicht, die es ermöglichten, während der Reaktion

einen großen Temperaturbereich zu durchlaufen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass optimale Temperaturen während der RT-Reaktion zumindest kurzzeitig vorherrschten. Für die potentielle SAMT von *N. alata* (N.ala.SAMT1) erfolgte die 3'RACE mittels eAMV-Kit (Sigma-Aldrich). Für die potentielle SAMT aus *N. suaveolens* (N.sua.SAMT1) und die BSMT-ähnlichen Sequenzen aus *N. alata* (N.ala.BSMT2-1) und *N. sylvestris* (N.syl.BSMT2-1) wurde das ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen) verwendet.

Die Isolation des 3'UTR-Bereichs der BSMT-ähnlichen Sequenz aus *N. suaveolens* (N.sua.BSMT2-1) und der potentiellen SAMT aus *N. sylvestris* (N.syl.SAMT1) erfolgte mittels RT-PCR über abgeleitete Primer.

Neben der N.sua.BSMT1-1 konnte aus Blüten noch eine weitere BSMT-ähnliche Sequenz isoliert werden (Hippauf, 2004). Diese Sequenz wurde als N.sua.BSMT1-2 (alte Bezeichnung: „BSMT2“) bezeichnet. Sie unterscheidet sich auf Nukleotidebene von der N.sua.BSMT1-1 durch lediglich 20 Austausche. Da es nun schwierig wäre, bei Expressionsuntersuchungen zwischen der N.sua.BSMT1-1 und der N.sua.BSMT1-2 zu unterscheiden, wurde auch hier eine 3'RACE durchgeführt. Der Grund dafür beruhte auf der Annahme, dass die 3'UTR-Bereiche auch sehr ähnlicher Gene erfahrungsgemäß größere Abweichungen voneinander aufweisen und so als Sonden, z.B. für Northern Blots, eingesetzt werden könnten. Hierfür wurde das eAMV-Kit (Sigma-Aldrich) verwendet.

Bei der verwendeten RNA handelte es sich um aus Blättern isolierte Gesamt-RNA. Für die N.sua.BSMT1-2 wurde die RNA aus Blüten isoliert. Für die Isolation der potentiellen SAMTs wurden die Blätter, welche für die RNA-Isolation dienten, zuvor mit 5 mM Salizylsäure induziert (siehe 2.2.11.2.2).

2.2.11.3.1 Identifizierung der 3'UTR-Bereiche mittels RT-PCR

Die Isolierung der 3'UTR-Bereiche der N.sua.BSMT2-1 Sequenz aus *N. suaveolens* und der N.syl.SAMT1 aus *N. sylvestris* erfolgten mittels RT-PCR. Dafür wurden aus dem 3'UTR-Bereich der bereits isolierten verwandten Sequenzen Primer abgeleitet und für die RT-Reaktion eingesetzt.

Die RT-PCR bei der N.syl.SAMT1 aus *N. sylvestris* erfolgte nach einem 60-minütigem DNase I-Verdau mittels ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Für die Reaktion wurden 2 µg RNA eingesetzt. Für die cDNA Synthese wurde 1 µl des Primers N.tab 3'UTR (10 pmol) verwendet. Die Reaktionsbedingungen für die RT-Reaktion waren wie folgt:

RT-Reaktion; Temperaturprogramm für die N.syl.SAMT1 aus *N. sylvestris*

10 min	65 °C
15 min	60 °C
5 min	57 °C
15 min	55 °C
5 min	52 °C
10 min	50 °C

Im Anschluss an die RT-Reaktion wurde eine PCR nach folgendem Muster durchgeführt:

PCR für N.syl.SAMT1 von *N. sylvestris***PCR-Ansatz:**

cDNA	5 µl
10 x Puffer (Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (Fermentas; 25 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM; Roth)	1 µl
fw. Primer: N.ala 3'RACE (10 pmol/µl)	2 µl
rev. Primer: N.tab 3'UTR (10 pmol/µl)	2 µl
Taq-Polymerase (Fermentas; 5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

2 min	94 °C	} 40 x
30 s	94 °C	
30 s	53 °C	
60 s	72 °C	
10 min	72 °C	
∞ min	10 °C	

Die RT-PCR bei der N.sua.BSMT2-1 Sequenz aus *N. suaveolens* erfolgte nach einem 60-minütigem DNase I-Verdau mittels ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen) bei 50 °C nach den Angaben des Herstellers. Für die Reaktion wurden 4 µg RNA eingesetzt. Für die cDNA Synthese wurde 1 µl eines Gemisches aus den Primern N.alaHRO long rev (10 pmol) und N.sylHRO long rev (10 pmol) verwendet. Die Reaktionsbedingungen für die PCR waren wie folgt:

PCR für die N.sua.BSMT2-1 aus *N. suaveolens***PCR-Ansatz:**

cDNA	5 µl
10 x Puffer (Fermentas; 25 mM)	2,5 µl
Mg Cl ₂ (Fermentas)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM; Roth)	1 µl
fw. Primer: N.sylv.fw1 (10 pmol/µl)	2 µl
rev. Primer: N.alaHRO long rev und N.sylHRO long rev (10 pmol)	2 µl
Taq-Polymerase (Fermentas; 5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

2 min	94 °C	} 40 x
30 s	94 °C	
30 s	50 °C	
60 s	72 °C	
10 min	72 °C	
∞ min	10 °C	

2.2.11.3.2 Identifizierung von 3'UTR-Bereichen mittels 3'RACE

Allen RT-Reaktionen ging ein 60-minütiger DNase I-Verdau voraus. Vor der RT-Reaktion wurde zu 2 µg DNase I verdauter RNA, 1 µl oligo dT-R2-Mix Primer (10 pmol) gegeben und der Ansatz 10 min auf 70 °C erhitzt. Darauf folgte die RT-Reaktion nach den Angaben des Herstellers. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

RT-Reaktion; Temperaturprogramm (nach Pott, 2004):

15 min	45 °C
3 min	+2 °C (vier Zyklen)
15 min	55 °C
3 min	+2 °C (vier Zyklen)
15 min	65 °C

Nach der RT-Reaktion wurden 5 µl der cDNA für die PCR eingesetzt.

PCR für die N.ala.SAMT1 von *N. alata*

PCR-Ansatz:

cDNA	5 µl
10 x AccuTaq Puffer (Kit)	5 µl
dNTP-Mix (Kit)	1 µl
fw. Primer: N.ala 3'RACE (10 pmol/µl)	5 µl
rev. Primer: R2 (10 pmol/µl)	5 µl
AccuTaq-Polymerase (Kit; 5 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

3 min	94 °C	} 30 x
45 s	94 °C	
30 s	52 °C	
1 min	72 °C	
5 min	72 °C	
∞ min	10 °C	

PCR für N.sua.SAMT1 von *N. suaveolens*

PCR-Ansatz:

cDNA	5 µl
10 x Puffer (Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (Fermentas; 25 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM; Roth)	1 µl
fw. Primer: N.sua 3'RACE (10 pmol/µl)	2 µl
rev. Primer: R2 (10 pmol/µl)	2 µl
Taq-Polymerase (Fermentas; 5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

2 min	94 °C	} 35 x
30 s	94 °C	
30 s	54 °C	
60 s	72 °C	
5 min	72 °C	
∞ min	10 °C	

PCR für N.syl.BSMT2-1 aus *N. sylvestris* und N.ala.BSMT2-1 aus *N. alata***PCR-Ansatz:**

cDNA	5 µl
10 x Puffer (Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (Fermentas; 25 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM; Roth)	1 µl
fw. Primer: N.syl RACE1fwFH (10 pmol/µl)	2 µl
rev. Primer: R2 (10 pmol/µl)	2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (Fermentas; 5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

2 min	94 °C	
30 s	94 °C	} 3 x
30 s	55 °C	
1 min	72 °C	
30 s	94 °C	} 4 x
30 s	4 mal vorherige Temp. -0,5 °C	
1 min	72 °C	
30 s	94 °C	
30 s	53 °C	} 33 x
1 min	72 °C	
5 min	72 °C	
∞ min	10 °C	

PCR für N.sua.BSMT2-1 von *N. suaveolens***PCR-Ansatz:**

cDNA	2,5 µl
10 x Puffer (Invitrogen)	2,5 µl
dNTP-Mix (Roth; je 10 mM)	0,75 µl
fw. Primer: Ns BSMT int5 fw (10 pmol/µl)	0,5 µl
rev. Primer: R2 (10 pmol/µl)	0,5 µl
MgSO ₄ (Invitrogen; 50 mM)	0,5 µl
<i>Pfx</i> -Polymerase (Invitrogen; 2,5 U/µl)	0,25 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

2 min	94 °C	} 35 x
20 s	94 °C	
40 s	54 °C	
2 min	68 °C	}
5 min	68 °C	
∞ min	10 °C	

2.2.11.4 Amplifizierung der codierenden Bereiche

Nach der Vervollständigung des codierenden Bereichs der isolierten Sequenzen sollten diese in Überexpressionsvektoren kloniert werden, um sie anschließend in *E. coli* überexprimieren zu können. Dafür wurden der pET 101/D-TOPO Vektor des ChampionTMpET Directional TOPO[®] Expression Kits (Invitrogen) bzw. der pET SUMO Vektor des ChampionTMpET SUMO-Protein Expression Systems (Invitrogen) verwendet. Beide Vektoren versehen das überexprimierte Protein mit einem zusätzlichen 6 x His-tag, wodurch es anschließend mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt werden kann. Die für die Überexpression der jeweiligen Proteine verwendeten Vektoren, inklusive der Primer und Reaktionsbedingungen für die PCR, sind aus Tab. 2.2 ersichtlich. Für die PCRs wurden immer 5 µl cDNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde nach einem 60-minütiger DNase I-Verdau von 2 µg RNA mittels SuperScriptTMIII Reverser Transcriptase (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers bei 50 °C durchgeführt. Die für die RT-Reaktion eingesetzten Primer entsprachen immer den in Tab. 2.2 genannten „reverse Primern“. In Tab. 2.2 sind nur die Vektoren aufgeführt, mit denen die Überexpression erfolgreich verlief. In der Regel wurden die einzelnen Sequenzen jedoch sowohl in den pET SUMO Vektor, wie auch in den pET 101/D-TOPO Vektor kloniert und anschließend Überexpressionsuntersuchungen durchgeführt. Die in Tab. 2.2 aufgeführte Nikotinsäure-Carboxyl-Methyltransferase (N.gos.NAMT1-1) wurde von Todd Barkman (Western Michigan University) zur Verfügung gestellt. Sie wurde aus Blüten von *N. gossei* isoliert und unterscheidet sich von der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* um 23 Nukleotide. Da sie in einem Vektor vorlag, der eine Aufreinigung des überexprimierten Enzyms über Ni-NTA-Säulen nicht ermöglichte, wurde sie in den pET SUMO Vektor kloniert.

Tabelle 2.2: Für die Überexpression der potentiellen BSMTs und -SAMTs verwendeten Vektoren, Primer und Reaktionsbedingungen.

Pflanze	verwendeter Vektor	Sequenz	Primer für PCR	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
<i>N. suaveolens</i>	pET SUMO	N.sua.SAMT1	fw: sylSAMTexpfw rev: suaSAMTexprev	siehe 2.2.11.1 Standard PCR- Ansatz mittels <i>Taq</i> - Polymerase	2 min 94 °C 30 s 94 °C 30 s 50 °C 1 min 72 °C 5 min 72°C
	pET 101/D- TOPO		fw: N.syl exp fw rev: sua exp rev	siehe 2.2.11.3.2 PCR für N.sua.BSMT2 -1 von <i>N. suaveolens</i>	2 min 94 °C 20 s 94 °C 40 s 50 °C 2 min 68 °C 5 min 68 °C
	pET SUMO	N.sua.BSMT2-1	fw: NsBSMTStartFH rev: suaHRO1exp rew	siehe 2.2.11.1 Standard PCR- Ansatz mittels <i>Taq</i> - Polymerase	2 min 94 °C 30 s 94 °C 30 s 50 °C 1 min 72 °C 5 min 72°C
	pET 101/D- TOPO	N.sua.BSMT1-2	siehe: Hippauf, (2004)	siehe: Hippauf, (2004)	siehe: Hippauf, (2004)
<i>N. alata</i>	pET 101/D- TOPO	N.ala.SAMT1	fw: N.syl exp fw rev: N.syl exp rev	siehe 2.2.11.3.2 PCR für N.sua.BSMT2 -1 von <i>N. suaveolens</i>	2 min 94 °C 20 s 94 °C 40 s 50 °C 2 min 68 °C 5 min 68 °C
	pET SUMO	N.ala.BSMT1-2	fw: alaHROexpfw2 rev: alaHROexprev2	siehe 2.2.11.1 Standard PCR- Ansatz mittels <i>Taq</i> - Polymerase	2 min 94 °C 30 s 94 °C 30 s 50 °C 1 min 72 °C 5 min 72°C
<i>N. sylvestris</i>	pET SUMO	N.syl.SAMT1	fw: sylSAMTexpfw rev: sylSAMTexprev	siehe 2.2.11.1 Standard PCR- Ansatz mittels <i>Taq</i> - Polymerase	2 min 94 °C 30 s 94 °C 30 s 50 °C 1 min 72 °C 5 min 72°C
	pET 101/D- TOPO	N.syl.BSMT2-1	fw: alaHROüefw rev: alaHROüerew	siehe 2.2.11.3.2 PCR für N.sua.BSMT2 -1 von <i>N. suaveolens</i>	2 min 94 °C 20 s 94 °C 40 s 54 °C 2 min 68 °C 5 min 68 °C
<i>N. gossei</i>	pET SUMO	N.gos.NAMT1-1	fw:NsBSMTStartFH rev: NgosrewSUMO	siehe 2.2.11.1 Standard PCR- Ansatz mittels <i>Taq</i> - Polymerase (1 µl Plasmid DNA für die PCR eingesetzt)	2 min 94 °C 30 s 94 °C 30 s 52 °C 1 min 72 °C 5 min 72°C

2.2.11.5 Expressionsuntersuchungen mittels RT-PCR

Neben der Substratspezifität von Enzymen ist die Kenntnis über die spezifische Expression von isolierten Sequenzen eine wichtige Voraussetzung, um Vorhersagen über die möglichen Funktionen von Proteinen in Pflanzen treffen zu können. Die RT-PCR stellte aufgrund ihrer hohen Sensitivität eine gute Methode für die Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der gesuchten mRNAs in unterschiedlichen Geweben dar. Um eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Versuche zu gewährleisten, war es notwendig, diese zu standardisieren. Dies geschah einerseits durch den Einsatz gleicher Mengen an Gesamt-RNA für die RT-Reaktionen und des Weiteren über Zuhilfenahme eines externen Standards. Als externer Standard wurde der Transkriptions-Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) verwendet, für den gezeigt werden konnte, dass er in *N. benthamiana* konstitutiv exprimiert wird (Dean et al., 2002).

Für die Untersuchungen wurde RNA aus verschiedenen verschiedenen Organen (Blatt, Wurzel, Spross, Blüte) zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. Bei Blatt und Blüten erfolgte die Ernte jeweils um 06.00; 12.00; 18.00 und 24.00 Uhr. Die Probenahme bei Spross und Wurzel erfolgte um 06.00 und 18.00 Uhr. Die Blüten wurden bis zu einem Blütenalter von drei Tagen geerntet. Bei Blättern und Blüten wurden jeweils drei-, bei Wurzeln und Spross jeweils zwei unabhängige Pflanzen beerntet und deren Proben vereinigt.

2.2.11.5.1 Expressionsuntersuchung der potentiellen BSMTs und SAMTs aus *N. sylvestris* und *N. alata*

Für die RT-Reaktionen wurden generell 2 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch. Anschließend erfolgte eine Überprüfung und wenn nötig erneute Einstellung der RNA-Konzentration mittels denaturierender Gelelektrophorese. Jeder RT-Reaktion ging ein einstündiger DNase I-Verdau voraus. Die RT-Reaktionen erfolgten jeweils für 1 h bei 52 °C mittels SuperScriptTMIII Reverser Transcriptase (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die für die RT-Reaktion und die anschließende PCR verwendeten Primer sind in Tab. 2.3 dargestellt. Für die PCRs wurde das *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen) verwendet. Die Ansätze und Reaktionsbedingungen waren bei allen Reaktionen identisch.

PCR-Ansatz für die potentiellen SAMTs und BSMT-ähnlichen Sequenzen aus *N. sylvestris* und *N. alata*

PCR-Ansatz:

cDNA	5 µl
Master Mix (Qiagen)	12,5 µl
fw. Primer (10 pmol/µl)	2 µl
rev. Primer (10 pmol/µl)	2 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

90 s	94 °C	} 20 - 40 x
30 s	94 °C	
30 s	54 °C	
60 s	72 °C	
5 min	72 °C	

Es wurden immer mehrere unabhängige PCRs mit unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt. Dadurch wurde einerseits sichergestellt, dass sich die Reaktion noch nicht im gesättigten Bereich befand, und andererseits konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die unterschiedlichen Zyklenzahlen überprüft werden.

Tabelle 2.3: Für die Expressionsuntersuchungen verwendeten Primer.

Pflanze	Sequenz	Primer für die RT-Reaktion	Primer für die PCR
<i>N. alata</i>	N.ala.SAMT1	Nala rew1	fw: Nala fw1 rev: Nala rew1
	N.ala.BSMT2-1	alaHROüerew	fw: N.sylv.fw1 rev: alaHROüerew
<i>N. sylvestris</i>	N.syl.SAMT1	Nala rew1	fw: Nala fw1 rev: Nala rew1
	N.syl.BSMT2-1	alaHROüerew	fw: N.sylv.fw1 rev: alaHROüerew

2.2.11.5.2 Untersuchung der Induzierbarkeit der potentiellen BSMTs und SAMTs aus *N. sylvestris* und *N. alata*

Es wurde die Induzierbarkeit der potentiellen SAMTs (N.syl.SAMT1; N.ala.SAMT1) und der BSMT-ähnlichen Sequenzen (N.syl.BSMT2-1; N.ala.BSMT2-1) mit Salizylsäure und Benzoessäure untersucht. Dafür wurden Blätter entlang der Mittelachse in ca. 1 x 1 cm große Stücke geschnitten. Anschließend wurden die Stücke der einen Blatthälfte bei RT für 24 h in 5 mM Salizylsäure bzw. 5 mM Benzoessäure inkubiert. Die Blattstücke der anderen Blatthälfte dienten als Negativkontrolle. Deren Inkubation erfolgte unter den gleichen Bedingungen, in Wasser. Die Mittelachse fand keine Verwendung. Um zu überprüfen, ob nicht schon durch das Schneiden der Blätter Veränderungen in der Genexpression der untersuchten Sequenzen auftraten, wurde vor Beginn der Behandlung eine Blattprobe

genommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Aus den so behandelten Blattproben wurde im Anschluss die Gesamt-RNA isoliert und je $2\text{ }\mu\text{g}$ unter den gleichen Bedingungen wie in 2.2.11.5.1 beschrieben für RT-Reaktionen - und je $5\text{ }\mu\text{l}$ der gebildeten cDNA für die darauf folgenden PCRs eingesetzt.

Salizylsäure	5 mM (pH 6,5)
Benzoessäure	5 mM (pH 6,5)

2.2.11.5.3 Standardisierung der Expressionsuntersuchungen mittels EF1 α

Die cDNA Synthese des EF1 α erfolgte mittels M-MLV reverser Transkriptase (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die Reaktionen wurden für 30 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 30 min bei $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Als Primer wurde EF1 rew1 verwendet. Die anschließenden PCRs verliefen unter folgendem Muster:

PCR-Ansatz für EF1 α von *N. sylvestris* und *N. alata* mittels Taq PCR Master Mix (Qiagen)

PCR-Ansatz:

cDNA	5 μl
Master Mix (Qiagen)	12,5 μl
fw. Primer: EF1 fw1 (10 pmol/ μl)	2 μl
rev. Primer: EF1 rew1 (10 pmol/ μl)	2 μl
ddH ₂ O	ad 25 μl

PCR-Reaktionsbedingungen:

90 s	94 $^{\circ}\text{C}$	} 20 - 30 x
30 s	94 $^{\circ}\text{C}$	
30 s	50 $^{\circ}\text{C}$	
30 s	72 $^{\circ}\text{C}$	
5 min	72 $^{\circ}\text{C}$	

Wie bereits bei 2.2.11.5.1 beschrieben, wurden auch hier immer mehre unabhängige PCRs mit unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt.

2.2.11.6 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung, ob ein gewünschtes DNA-Fragment nach einer Chemotransformation in den gewachsenen *E. coli*-Kolonien stabil integriert vorlag, wurde mit genspezifischen Primern eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Holzstäbchen in $30\text{ }\mu\text{l}$ ddH₂O überführt und anschließend 10 min bei $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Daraufhin wurden $5\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung für eine PCR mit 35 Zyklen eingesetzt.

PCR-Ansatz:

<i>E. coli</i> -Suspension	5 µl
10 x Puffer (Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (Fermentas; 25 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM; Roth)	1 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	2 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (Fermentas; 5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

90 s	94 °C	} 35 x
30 s	94 °C	
30 s	50–60 °C	
30 s – 60 s	72 °C	
5 min	72 °C	
∞ min	10 °C	

2.2.12 Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde das enzymatische Kettenabbruchverfahren nach Sanger angewendet (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierreaktion wurde mittels SequiThermEXEL™ II DNA Sequencing Kit-LC (Biozym) nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurden IRD markierte Primer verwendet (Tab. 6.2). Die Anlagerungstemperatur der Primer an die DNA richtete sich nach den verwendeten Primern. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 6,5 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgel und 1 x TBE als Laufpuffer. Für die Auswertung wurde das Detektionssystem LI-COR der Firma MWG-Biotech genutzt.

10 x TBE-Puffer: 1,34 M Tris; 0,45 M Borsäure; 25 mM EDTA

Long Ranger: 50 % Acrylamid- Stammlösung (FMC Bio Products, USA)

Sequenziergel: 21 g Harnstoff; 30 ml ddH₂O; 5 ml 10 x TBE-Puffer; 500 µl DMSO; 350 µl 10 % (w/v) APS; 6,5 ml Long Ranger; 50 µl TEMED

2.2.13 Überexpression der heterolog in *E. coli* exprimierten Enzyme

Für Funktionsuntersuchungen der potentiellen BSMTs und SAMTs war es notwendig, diese zu überexprimieren und anschließend aufzureinigen. Dafür wurden die codierenden Sequenzen in Überexpressionsvektoren transferiert und anschließend die Proteine durch geeignete *E. coli*-Überexpressionsstämme synthetisiert. Hierbei stellte sich heraus, dass selbst die Enzyme, die eine sehr hohe Identität auf Aminosäureebene aufwiesen, durchaus unterschiedliche Bedingungen für eine optimale Überexpression benötigten. Deshalb mussten die geeigneten Bedingungen unabhängig für jedes Protein neu bestimmt werden. Es

zeigte sich, dass neben der Wahl des Expressionsstammes die Temperatur einen maßgeblichen Einfluss auf eine gelungene Überexpression besaß.

Für die Überexpressionsuntersuchungen wurden die Stämme HMS174(DE3) und BL21(DE3), welcher das zusätzliche Helferplasmid pSBET-b enthielt, verwendet. Das pSBET-b Plasmid enthielt ein Gen, welches für die Arginin tRNA mit den in *E. coli* seltenen Codons AGA/AGG codiert.

Die Überexpressionsuntersuchungen wurden immer sowohl bei 20 °C, wie auch bei 30 °C durchgeführt. Sofern sie bei diesen Temperaturen nicht erfolgreich waren, erfolgten sie zusätzlich noch bei 14 °C und bei 37 °C. Für die Überexpression wurden 100 ml Hauptkultur mit 3 ml einer 10 ml LB-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Kulturen unter schütteln auf die für die Überexpression benötigte Temperatur abgekühlt. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,6 erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG (1 M Stammlösung). Daraufhin wurden die Kulturen bei 20 °C und 30 °C für 20 Stunden und 200 rpm geschüttelt. Um zu überprüfen, ob rekombinantes Protein gebildet wurde, schloss sich zum einen der Versuch an mögliche Produkte mittels GC-MS Messung nachzuweisen (siehe 2.2.19.1), zum anderen wurde ein Teil der Kultur abgenommen, abzentrifugiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und der erhaltene *E. coli*-Rohextrakt im radioaktiven Test auf das Vorhandensein aktiven Enzyms untersucht (siehe 2.2.20). Sofern sich in beiden Voruntersuchungen Enzymaktivität nachweisen ließ, wurden die entsprechenden Kultivierungsbedingungen für die Überexpression verwendet und anschließend die Enzyme aufgereinigt.

2.2.14 Aufreinigung von überexprimierten Enzymen

Die Aufreinigung erfolgte mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie. Die Proben wurden unter nativen Bedingungen bei 4 °C aufgearbeitet. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 6000 rpm wurde der Überstand verworfen und 4 ml Lysispuffer, dem immer kurz vor Gebrauch 1 mg/ml Lysozym zugegeben wurde, auf das Pellet gegeben. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Proben auf Eis, gefolgt von dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (8 x 10 s; Intensität 50 %; 50 Impulse/min). Die *E. coli*-Suspension wurde anschließend bei 10000 rpm für 30 min zentrifugiert, der Überstand (ca. 4 ml) in eine zuvor mit 1 ml Ni-NTA-Agarose versehene Säulen (Bio-Rad) gefüllt und 1 h bei 4 °C und 180 rpm geschüttelt. Bei diesem Schritt wurden die mit dem His-tag versehenen Proteine an die Matrix gebunden. Anschließend wurde das Eluat

aufgefangen und die Säule mit 2 x 2 ml Waschpuffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Elution mit 4 x 500 µl Elutionspuffer. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Eluate erfolgte durch die Bradford-Methode (Bradford, 1976).

Lysispuffer: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 10 % Glycerol; 10 mM β-Mercaptoethanol; pH 8,0

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 40 mM Imidazol; 10 % Glycerol; 10 mM β-Mercaptoethanol; pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; 10 % Glycerol; 10 mM β-Mercaptoethanol; pH 8,0

2.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford, (1976). Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau in saurem Milieu unspezifisch an Proteine zu binden, wodurch das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verschoben wird (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteine musste zunächst eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) nach folgendem Schema (Tab. 2.4) angefertigt werden:

Tabelle 2.4: Pipettierschema für die Erstellung einer Eichreihe. (Angaben in µl)

BSA (µg/µl)	1	2	4	6	8	10
BSA (0,2 µg/µl)	5	10	20	30	40	50
H₂O	695	690	680	670	660	650
Puffer	100	100	100	100	100	100
Bradford-Reagenz	200	200	200	200	200	200

Für alle als Doppelansatz erstellte Proben wurden die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Aus den Mittelwerten wurde eine Regressionsgerade berechnet, die für die Bestimmung der unbekannt Proteinkonzentrationen in den Proben diente.

Sämtliche zu untersuchende Proben wurden als Doppelansätze nach folgendem Muster pipettiert:

H ₂ O	700 µl
Bradford-Reagenz	200 µl
Puffer	90 µl
Probe	10 µl

Als Puffer wurde immer derjenige eingesetzt, in dem sich auch die zu messenden Proteine befanden.

2.2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) fand für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht Verwendung. Für die Herstellung der Gele und für die Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN[®]II Elektrophoresis Cell System (Bio-Rad) genutzt. Für die Elektrophorese wurden lösliche Proteine mit einem Volumen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt. Zu Proteinen aus der unlöslichen Fraktion wurden 500 µl 1 x SDS-Probenpuffer hinzu gegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Der Gellauf erfolgte bei 120 V für 90 min in 1 x SDS-Laufpuffer. Anschließend wurden die Gele entweder mittels Coomassie-Brillantblau gefärbt und danach getrocknet, oder für einen Western-Blot weiter verwendet. Als Größenstandard fand der Low-Range Marker (Roche) Anwendung. Für Western-Blots wurde der Roti-Mark Prestained-Marker (Roth) verwendet. Von den Größenstandards wurden immer 5 µl und von den Proben 20 µl auf das Gel aufgetragen.

5 x SDS-Laufpuffer:	15 g Tris; 72 g Glycin; 5 g SDS; pH 8,3; ad ddH ₂ O 1 l
2 x SDS-Probenpuffer:	2,5 ml 1 M Tris; 2 ml Glycerin (100 %); 0,2 ml β – Mercaptoethanol; 1 ml Bromphenolblau (Stammlösung 1 %); 5 ml SDS (Stammlösung 10 %); pH 6,8; ad ddH ₂ O 10 ml
Trenngel:	1,25 ml 1,5 M Tris-Puffer, (pH 8,8); 2,1 ml Acrylamid 30 %ig; 1,6 ml ddH ₂ O; 5 µl TEMED; 50 µl APS
Sammelgel:	415 µl 0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8); 220 µl Acrylamid 30 %ig; 1 ml ddH ₂ O; 2 µl TEMED; 10 µl APS

2.2.17 Coomassiefärbung

Im Anschluss an die SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese (siehe 2.2.16) wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt, das Trenngel in Fixierlösung überführt und dort 30 min geschwenkt. An die Fixierung schloss sich die Färbung an, welche vorzugsweise über Nacht erfolgte. Um unspezifisch gebundenen Farbstoff zu entfernen, wurde anschließend ca. 2 h entfärbt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT unter leichtem Schütteln. Die Gele wurden in der Fotodokumentationsanlage von MWG fotografiert und gespeichert. Die Trocknung der Gele erfolgte zwischen Cellulosefolien in der Mini Dry-Anlage (Invitrogen).

Fixierer: 25 % (v/v) iso-Propanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 65 % (v/v) ddH₂O

Färbelösung: 0,0006 % (w/v) Coomassie R250; 10 % (v/v) Essigsäure; 90 % (v/v) ddH₂O

Entfärber: 10 % (v/v); Essigsäure; 90 % (v/v) ddH₂O

2.2.18 Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen, wurden diese nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine feste PVDF-Membran (Roth) transferiert und dort immobilisiert. Für das Elektroblotting wurde die Xcell II™ Mini-Cell Blotapparatur (Invitrogen) verwendet. Die Membran wurde vor Gebrauch 30 s in 99,8 %igen Ethanol und daraufhin kurz in ddH₂O und Towbins-Puffer geschwenkt. Anschließend erfolgt der Aufbau der Blot-Anlage. Dafür wurde auf zwei zuvor in Towbins-Puffer angefeuchtete Schwämme ein ebenfalls in Puffer angefeuchtetes Stück Filterpapier (Gel-Blotting Papier; Roth) gelegt. Auf das Filterpapier wurden das Polyacrylamidgel, die angefeuchtete PVDF-Membran, ein erneutes Stück in Puffer angefeuchteten Filterpapiers und eine weitere Schicht aus zwei Schwämmen gelegt. Sollten zwei Gele gleichzeitig geblottet werden, so wiederholte sich die zuvor beschriebene Prozedur für das zweite Gel noch einmal. Der Blotvorgang wurde 2 h bei 100 mA und ca. 25 V durchgeführt. Im Anschluss erfolgte der immunologische Nachweis der auf die Membran übertragenen Enzyme.

Für die anschließende immunologische Detektion wurde die Membran 3 x 3 min in TBS-T und daraufhin über Nacht in Blockierungslösung unter ständigem Drehen, bei RT, im Hybridisierungsoven inkubiert. Anschließend erfolgte ein 3 x 5-minütiges Waschen der

Membran in TBS-T Puffer, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation mit dem primären Antikörper (AK) in Blockierungslösung. Als primäre Antikörper wurden der Poly-His-AK, welcher spezifisch an die Histidin reichen Enden der überexprimierten Enzyme bindet bzw. ein für die N.sua.BSMT1-1 aus *N. suveolens* spezifischer Antikörper (Davids Biotechnology) verwendet. Nach einem erneuten Waschschrift (3 x 10 min) wurde die Membran mit dem sekundären AK für 2 h inkubiert. Als sekundäre Antikörper fanden der His-anti-mouse-AK bzw. der BSMT-anti-rabbit-AK jeweils in einer Verdünnung von 1 : 20000 in TBS-T Puffer Anwendung. Der Inkubation mit dem sekundären Antikörper folgten jeweils ein 6-maliges Waschen mit TBS-T Puffer und TBS. Den Abschluss bildete eine 10-minütige Inkubation in Detektionspuffer.

Die Sichtbarmachung der Antikörperbindung und somit der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte mittels CSPD (Roche) und NBT/BCIP. Bei CSPD handelt es sich um ein Chemielumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase. Die Detektion erfolgte mittels Image-Reader (Fuji). Für eine dauerhafte Färbung diente die Reaktion mit NBT und BCIP. Hierbei entsteht auf der Membran ein violett gefärbtes Endprodukt. Dafür wurde die Membran mit 10 ml Detektionspuffer, der 30 µl NBT und 15 µl BCIP enthielt, für ca. 30 min inkubiert und anschließend mit Wasser abgespült und getrocknet.

Towbins-Puffer:	12 mM Tris; 96 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
10 x TBS-Puffer:	0,2 M Tris-HCl, (pH 7,4); 5 M NaCl
1 x TBS-Triton:	0,05 % (v/v) Triton X ₁₀₀ ; 10 % (v/v) 10 x TBS
Blockierungslösung:	1 x TBS-Triton; 4 % (w/v) Magermilchpulver; 1 % (w/v) BSA
Detektionspuffer:	100 mM Tris-HCl, (pH 9,5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O
NBT-Stammlösung:	50 mg/ml NBT (Nitroblau-Tetrazolium Salz) in 70 % DMF
BCIP-Stammlösung:	50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-Phosphat) in 100 % DMF

2.2.19 GC-MS Analysen

2.2.19.1 Funktionsnachweis der überexprimierten Enzyme durch GC-MS

Durch GC-MS konnten erste Einblicke darüber gewonnen werden, ob die überexprimierten Enzyme funktionell aktiv waren und welche Substrate sie bevorzugt umsetzten. Für diese Untersuchungen wurden für die Überexpression geeignete *E. coli*-Stämme in Flüssigkultur verwendet. Bei den Stämmen handelte es sich um HMS174(DE3) und BL21(DE3), welcher das zusätzliche Helferplasmid pSBET-b enthielt.

Für die GC-MS Untersuchungen wurden, wie in 2.2.13 beschrieben, eine Hauptkultur bis zu einer OD_{600} von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) und des entsprechenden Substrates (Endkonzentration 1 mM). Als Negativkontrollen wurde jeweils der entsprechende *E. coli*-Stamm ohne Plasmid mitgeführt bzw. wurden IPTG und Substrat voneinander getrennt zugegeben. Weiterhin enthielten die Kulturen die für die Selektion der jeweiligen Plasmide benötigten Antibiotika.

Die Inkubation der Hauptkulturen erfolgte für 20 h bei 20 °C bzw. bei 30 °C bei 200 rpm. Anschließend wurden sie bei 6000 rpm 15 min zentrifugiert und 40 ml des Überstands mit 3 ml Hexan ausgeschüttelt. Nach der Zugabe von 10 µl Nonylacetat einer 1,5 mg/ml Stammlösung wurden die Ansätze, um die Phasen zu trennen, erneut bei 10000 rpm für 30 min zentrifugiert und daraufhin 120 µl für die GC-MS Analyse aus der Hexanphase abgenommen. Für die Messung wurde als Lösungsmittelkontrolle reines Hexan mit Nonylacetat (5 ng/µl) verwendet. Die GC-MS Messung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Injektion:	1 µl, Split Ratio 1
Injektortemperatur:	200 °C
Interface Temperatur:	300 °C
Temperaturprogramm des Ofens:	- Beginn bei 35 °C, Dauer 2 min - Hochheizen auf 280 °C, bei einer Rate von 10 °C/min, - Halten für 15 min.
Kapillarsäule:	DB-5; 60 m x 0,25 mm
Einstellungen des Massenspektrometers:	1,3 kV, solvent cut time 10 min, m/z von 41-280, Scanrate 0,5 sec

Verwendete Substrate:

Benzoessäurestammlösung:	50 mM Benzoessäure in Ethanol gelöst
Salizylsäurestammlösung:	50 mM Salizylsäure in Ethanol gelöst
Nikotinsäurestammlösung:	50 mM Nikotinsäure in H ₂ O gelöst

2.2.19.2 Bestimmung des Blütenduftes von *N. suaveolens*, *N. alata* und *N. sylvestris* mittels GC-MS

Während Methylsalizylat und vor allem Methylbenzoat im Blütenduft von *N. suaveolens* in relativ hohen Mengen vorkommen, wurden diese Verbindungen in *N. sylvestris* und *N. alata* nur in geringen Quantitäten nachgewiesen (Raguso et al., 2003a). Um zu überprüfen, welche Verbindungen sich unter den verwendeten Anbau- und Wachstumsbedingungen (siehe 2.2.1) bei den einzelnen Pflanzen nachweisen ließen, wurden die emittierten Duftstoffe mit Hilfe einer *Headspace* Apparatur gesammelt und mittels GC-MS Messungen identifiziert. Dafür wurden Blüten in Glaskugeln mit 2 Öffnungen eingesetzt. Die erste Öffnungen dienten als Anschluss für einen Kompressor, der mittels eines Aktivkohlefilters gereinigte Luft in die Kugel hineinleitete, die zweite Öffnung wurde für den Ausstrom der Luft benötigt. Die ausströmende Luft wurde über ein mit dem Adsorbens Super Q (Firma Alltech) gefüllten Adsorptionsröhrchen geleitet. Um einen erhöhten Ausstrom zu gewährleisten, fand zusätzlich eine Vakuumpumpe (Firma KNF Neuberger) zum Ansaugen der Luft Verwendung.

Da die Menge an emittierten Verbindungen bei *N. suaveolens*, *N. alata* und *N. sylvestris* sehr unterschiedlich sind, mussten für einen optimalen Nachweis der Verbindungen unterschiedliche Bedingungen gewählt werden. Bei *N. suaveolens* bzw. *N. alata* erfolgte eine Messung von jeweils 2 Blüten über einen Zeitraum von 6 bzw. 2 Stunden bei 2 Tage alten Blüten. Bei *N. sylvestris* erfolgte eine Messung von 4 Blüten über die gesamte Blühperiode von 3 Tagen. Die Eluierung der an das Säulenmaterial gebundenen Duftstoffe erfolgte durch Dichlormethan. Je 300 µl des Lösungsmittels wurden auf das Adsorbens gegeben und die gebundenen Substanzen mittels Druckluft gelöst. Die Eluate wurden unter den in 2.2.19.1 beschriebenen Bedingungen durch GC-MS Analyse vermessen.

2.2.20 Aktivitätstest der heterolog exprimierten und aufgereinigten Enzyme

Die Enzymtests wurden radioaktiv *in vitro* durchgeführt. Dabei war das Kohlenstoffatom der durch SAM übertragenen Methylgruppe radioaktiv markiert. Bei der Reaktion erfolgte die Übertragung der aktivierten Methylgruppe des SAM auf die Carboxylgruppe des Substrates. Die Auswertung erfolgte quantitativ über Szintillationsmessungen.

Die Untersuchungen erfolgten nach folgendem Muster (Änderungen werden im Text erwähnt):

allgemeiner Ansatz:

10 µl	Enzym
10 µl	Inkubationspuffer (i. Allg. Tris-HCl; pH 7)
1 µl	Substrat
28 µl	H ₂ O
1 µl	¹⁴ C-SAM

Negativkontrolle:

10 µl	Enzym
10 µl	Inkubationspuffer (Tris-HCl; pH 7)
1 µl	Ethanol bzw. H ₂ O
28 µl	H ₂ O
1 µl	¹⁴ C-SAM

Die Ansätze wurden gemischt, anzentrifugiert und 40 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionen mit 3 µl HCl abgestoppt und die Ansätze mit 100 µl Ethylacetat überschichtet. Dadurch kam es zur Phasenbildung, wobei in der unteren wässrigen Phase das restliche SAM und in der oberen organischen Phase das Produkt enthalten war. Nach kurzem Schütteln und 1-minütiger Zentrifugation wurden 30 µl aus der oberen organischen Phase in 2 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und im Szintillator (TriCarb, Packard BioScience) gemessen. Den Blindwert stellte bei jeder Messreihe eine Probe mit 2 ml reiner Szintillationsflüssigkeit dar. Weiterhin wurden immer zwei Negativkontrollen mitgeführt. Diesen wurde Wasser bzw. Ethanol zugegeben. Die Behandlung der Kontrollen war identisch zu den übrigen Ansätzen. Um die zugegebene Menge an Radioaktivität abzuschätzen und den Substratumsatz in pmol bestimmen zu können, wurden 30 µl aus der wässrigen Phase der Negativkontrollen gemessen und dadurch die Aktivität in dpm ermittelt. Die Berechnung der für 30 µl eingesetzten Stoffmenge an SAM erfolgte anhand der vom Hersteller angegebenen Daten. Durch die gemessene dpm-Zahl der Gesamtaktivität in 30 µl, der berechneten Stoffmenge von SAM und der ebenfalls in dpm gemessenen Aktivität der Versuchsproben im organischen Überstand, konnte die gebildete Produktmenge bestimmt werden. Es wurden immer Doppelansätze gemessen und zwei unabhängige Testreihen untersucht.

2.2.20.1 Untersuchung der Substratspezifität

Für die Untersuchung der Substratspezifität wurden als Substrate sterisch ähnliche Verbindungen der Benzoesäure verwendet. Neben der Nikotinsäure, die in Wasser gelöst wurde, lagen alle Substrate in einer Konzentration von 50 mM in Ethanol gelöst vor. Der Test wurde bei RT wie in 2.2.20. beschrieben durchgeführt. Als Substrate wurden getestet:

Benzoessäure, 2-Hydroxybenzoessäure (Salizylsäure), 3-Hydroxybenzoessäure,
4-Hydroxybenzoessäure, 2,3-Dihydroxybenzoessäure, 2,4-Dihydroxybenzoessäure,

2,5-Dihydroxybenzoesäure, 2,6-Dihydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure,
3,5-Dihydroxybenzoesäure, Zimtsäure, 2-Hydroxyzimtsäure, 3-Hydroxyzimtsäure,
4-Hydroxyzimtsäure, 2-Methoxybenzoesäure, Jasmonsäure, Nikotinsäure.

3. Ergebnisse

3.1 *N. suaveolens*

3.1.1 Potentielle BSMT

3.1.1.1 Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene

Oft werden in Pflanzen gleichzeitig mehrere unterschiedliche Gene, deren Genprodukte in der Lage sind die gleichen Reaktionen zu katalysieren, exprimiert. So wurden bereits zwei vorzugsweise Methylsalizylat synthetisierende BSMTs aus *Petunia hybrida* isoliert (Negre et al., 2003). Auch in *N. suaveolens* konnte neben der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 eine weitere BSMT-ähnliche Sequenz (alt: „BSMT2“) nachgewiesen werden (Hippauf, 2004). Untersuchungen auf genomischer Ebene sollten Aufschluss über die mögliche Existenz weiterer BSMT-ähnlicher Sequenzen liefern.

Für die Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen wurden Primer von der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* abgeleitet. Der Vorsatz „N.sua“ kennzeichnet die Art, aus der die BSMT-ähnliche Sequenz isoliert wurde. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird deutlich, dass in *N. suaveolens*, *N. alata* und *N. sylvestris* zueinander orthologe BSMT-ähnliche Sequenzen existieren. Diese Sequenzen lassen sich unterschiedlichen „Typen“ zuordnen. Dabei unterscheiden sich die Mitglieder der einzelnen Typen weniger in ihrer Substratspezifität als vielmehr in ihrer Verwandtschaft zueinander. Die Enzymnamen wurden so gewählt, dass die erste Zahl hinter dem Namen den Typ angibt (z.B. N.sua.BSMT1 gehört zum BSMT-Typ-1). Die durch einen Bindestrich von der Typennummer abgegrenzte zweite Zahl ist spezifisch für das jeweilige Enzym (z.B. BSMT1-1; BSMT1-2). Die neben der N.sua.BSMT1-1 aus Blüten isolierte „BSMT2“ gehört ebenfalls zum BSMT-Typ-1 und wird im weiteren Verlauf als „**N.sua.BSMT1-2**“ bezeichnet. Bei den isolierten SAMTs wurden keine unterschiedlichen Typen nachgewiesen. Deshalb wird bei diesen Sequenzen keine zusätzliche Typenbezeichnung angegeben. Die Zahl hinter dem Namen ist spezifisch für das Enzym. Somit bedeutet der Name „N.sua.SAMT1“, dass es sich bei diesem Enzym um die erste aus *N. suaveolens* isolierte SAMT handelt.

Für die Sequenzierungen der isolierten Fragmente wurde der LI-COR der Firma MWG-Biotech genutzt. In *N. suaveolens* wurden insgesamt 11 BSMT-ähnliche Fragmente erhalten (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Aufgrund der Sequenzvergleiche lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den 11 erhaltenen Fragmenten um mindestens 7 unterschiedliche Gene handeln muss. Vier Fragmente hatten hohe Sequenzähnlichkeit mit der N.sua.BSMT1-1 (Abb. 3.1 B; Fragment 1-4). Die Fragmente 1-3 hatten die gleiche Sequenz, überlappten einander und

enthielten keine Introns (Abb. 3.1 B). Sie waren 334 bp; 428 bp und 598 lang und entsprachen einem Bereich ab Basenpaar 467 der N.sua.BSMT1-1 bis zum Stoppcodon. Das Fragment 4, deren Sequenz ebenfalls mit der der N.sua.BSMT1-1 übereinstimmte, hatte eine Länge von 1348 bp, wobei es einem Bereich der N.sua.BSMT1-1 vom Startcodon bis zu Basenpaar 617 entsprach. Es enthielt zwei Introns mit einer Länge von 143 bp und 588 bp (Abb. 3.1 B).

Das Fragment 5 enthielt ein Intron mit einer Länge von 294 bp und war insgesamt 642 bp lang. Die codierende Region weist 26 Austausche zur N.sua.BSMT1-1 Sequenz auf und zeigt hohe Übereinstimmung mit den Fragmenten 10 und 11 (Abb. 3.1 C).

Weiterhin wurden 3 PCR-Fragmente isoliert, die mit der N.sua.BSMT1-2 Sequenz übereinstimmten (Abb. 3.1 D). Fragment 7 und 8 besaßen keine Introns, wobei das Fragment 8 den gesamten Bereich von Start- bis Stoppcodon abdeckte. Das Fragment 6 (Abb. 3.1 D) unterschied sich ebenfalls nicht von der N.sua.BSMT1-2, besaß aber zwei Introns. Sie hatte eine Gesamtlänge von 928 bp. Die Introns hatten Längen von 143 bp und 168 bp.

Bei einem weiteren Fragment (Abb. 3.1 E; Fragment 9) handelte es sich um eine im Vergleich zur N.sua.BSMT1-1 verkürzten Sequenz. Es hatte eine Gesamtlänge von 536 bp und enthielt ein Intron von 143 bp. Weiterhin zeigte sie Sequenzähnlichkeit sowohl mit der N.sua.BSMT1-1 wie auch mit der N.sua.BSMT1-2.

Bei dem Vergleich der Introns konnte festgestellt werden, dass die vorderen Introns (I 1) der Fragmente 4 und 6 sowohl in ihrer Lage und Länge, wie auch ihrer Sequenz identisch zueinander waren. Das Intron aus *N. suaveolens* Fragment 9 entsprach bis auf 4 Austausche dem Intron der *N. suaveolens* Fragmente 4 und 6. Das erste Intron des Fragments 5 begann an der gleichen Position wie die der Fragmente 4; 6 und 9, unterschied sich allerdings von ihnen in Länge und Sequenz. Es gab jedoch kurze übereinstimmende Sequenzen direkt am Anfang und am Ende der Introns. Das gleiche konnte bei den zweiten Introns (I 2) der Fragmente 4 und 6 beobachtet werden, wobei hier die übereinstimmenden Sequenzen vor allem am Anfang der Introns deutlich kürzer waren als bei den ersten Introns der Fragmente 4 und 5 (siehe Anhang 6.3.2.1.1).

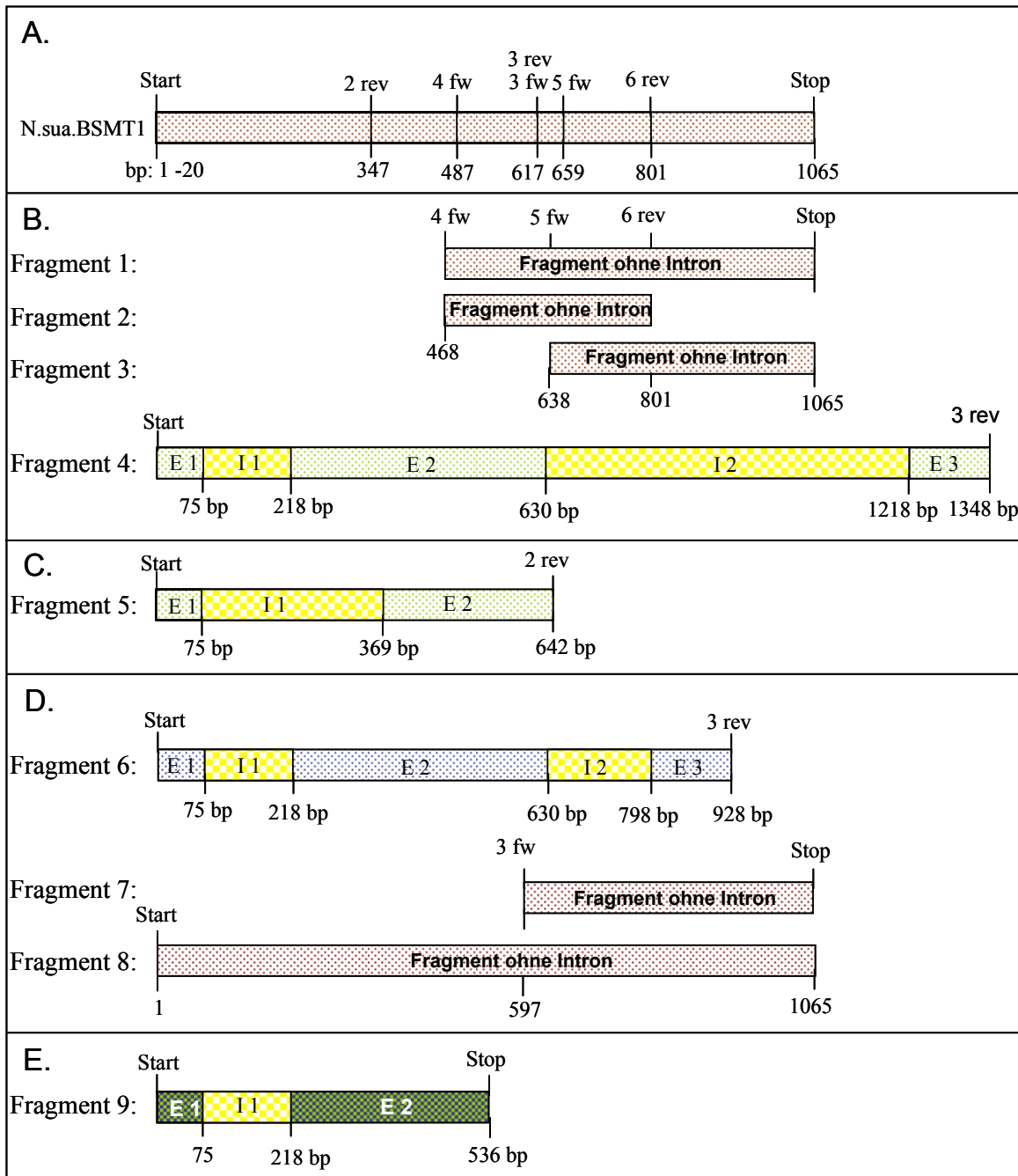


Abbildung 3.1: Übersicht über die aus *N. suaveolens* mittels PCR isolierten Fragmente.

A: Zeigt zum Vergleich die N.sua.BSMT1-1 ohne Introns. Über der N.sua.BSMT1-1 sind die verwendeten Primer und darunter deren Lage auf der N.sua.BSMT1-1 eingezeichnet. **B:** Zeigt Fragmente, die in ihrer codierenden Sequenz mit der N.sua.BSMT1-1 übereinstimmen. Über den Fragmenten sind die Primer angegeben, mit welchen sie erhalten wurden und darunter die Position entsprechend zur N.sua.BSMT1-1 (Fragment 1-3), bzw. die Position der Exon-Intron Übergänge (Fragment 4). **C:** Zeigt das Fragment 5. Es enthielt 26 Austausche zur N.sua.BSMT1-1 und zeigte größere Ähnlichkeiten zu den Fragmenten 10 und 11; der späteren N.sua.BSMT2-1. **D:** Zeigt die Fragmente die in ihrer codierenden Sequenz mit der N.sua.BSMT1-2 übereinstimmen. **E:** Zeigt ein im Vergleich zur N.sua.BSMT1-1 verkürztes Fragment, welches sich in seiner Sequenz weder der N.sua.BSMT1-1 noch der N.sua.BSMT1-2 eindeutig zuordnen ließ.

Zwei BSMT-ähnliche Fragmente konnten durch die TaKaRa-Polymerase amplifiziert werden (Fragmente 10 und 11; Abb. 3.2). Sie unterschieden sich eindeutig von der N.sua.BSMT1-1 und der N.sua.BSMT1-2. Sie besaßen jedoch hohe Ähnlichkeit mit dem Fragment 5. Aufgrund ihrer Größe von etwa 3000 und 3500 bp wurden sie vorerst nur ansequenziert (siehe Anhang 6.3.2.1). Beide Fragmente enthalten jeweils zwei Introns. Die ersten Introns beginnen wie die zweiten Introns der Fragmente 4 und 6 (Abb. 3.1) an Position 487, allerdings besitzen sie keine signifikanten Sequenzübereinstimmungen mit den Introns dieser Fragmente. Für die zweiten Introns konnte kein genauer Startpunkt bestimmt werden. Er wird sich aber ungefähr zwischen Position 734 und 751 befinden. Die codierenden Sequenzen der Fragmente 5; 10 und 11 lassen sich der nachfolgend beschriebenen **N.sua.BSMT2-1** zuordnen.

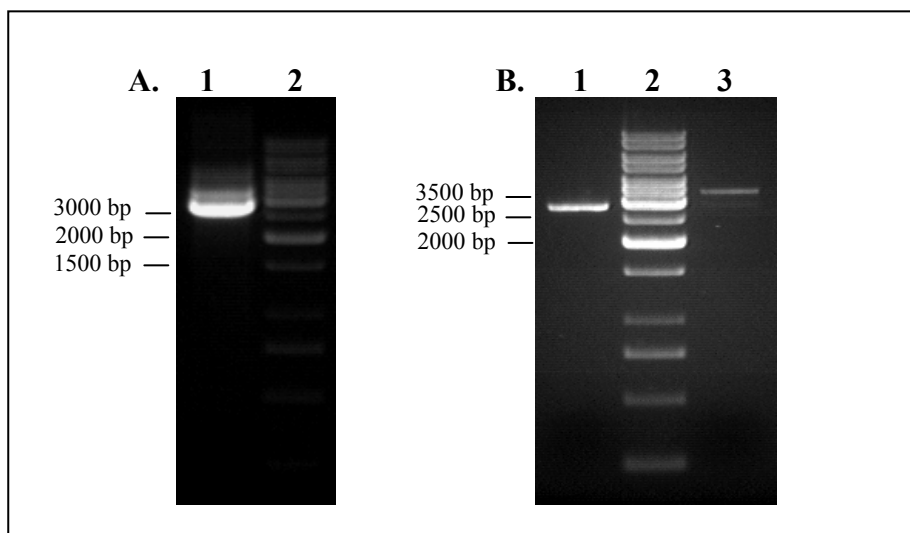


Abbildung 3.2: Amplifizierung zweier BSMT-ähnlicher Fragmente mittels PCR.

A: Zeigt das Ergebnis der PCR mittels TaKaRa-Polymerase. **B:** Zeigt die aufgereinigten Fragmente 10 (Spur 1) und 11 (Spur 3) nach der Gelelektion. (Spur 2); 1000 bp Marker. Die Auftrennung erfolgte jeweils durch ein 1 %iges Agarosegel.

Der codierende Bereich der isolierten Fragmente stimmt mit der nachfolgend beschriebenen **N.sua.BSMT2-1** überein.

3.1.1.2 Expressionsüberprüfung

Durch die Suche von BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene von *N. suaveolens* konnten 11 unterschiedliche Fragmente isoliert werden. Von diesen Fragmenten zeigten die Fragmente 5, 10 und 11 deutliche Abweichungen von der N.sua.BSMT1-1 bzw. der N.sua.BSMT1-2 Sequenz aus *N. suaveolens*. Obwohl sie sich in ihren Intronsequenzen unterschieden, waren die gefundenen codierenden Bereiche identisch. Mittels RT-PCR konnte mit drei verschiedenen Primerpaaren die Expression dieser Sequenz im Blatt nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Durch die anschließende Sequenzierung der erhaltenen Fragmente konnte gezeigt werden, dass es sich bei den erhaltenen Fragmenten um die gesuchte Sequenz

(N.sua.BSMT2-1) handelte. Zudem konnte eine von der gesuchten Sequenz abweichende weitere BSMT-ähnliche Sequenz isoliert werden (Fragment 12). Diese Sequenz wurde als „N.sua.BSMT3-1“ bezeichnet (siehe 6.3.1.1).

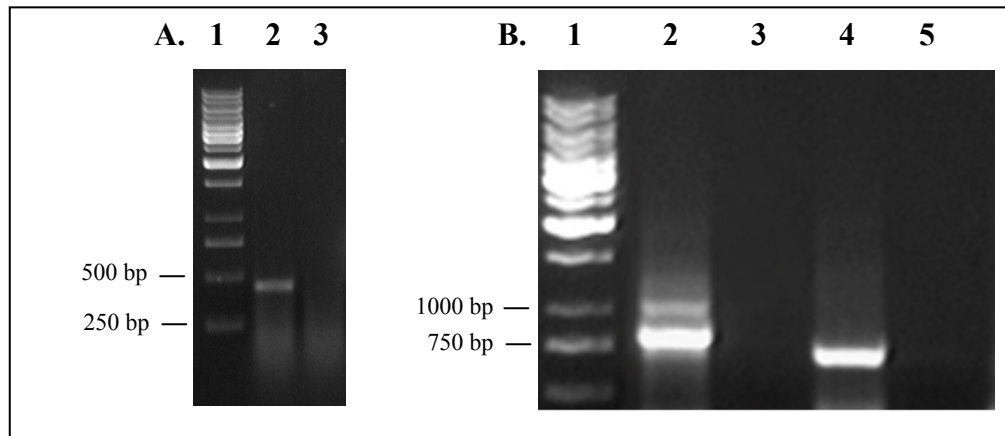


Abbildung 3.3: Expressionsüberprüfung der gefundenen BSMT-ähnlichen Sequenz (N.sua.BSMT2-1) in *N. suaveolens*.

A: Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination: NsBSMTStartFH + alaHRO 5'RACE nested (Spur 2); 1000 bp-Marker (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3); **B:** Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination: NsBSMTStartFH + N.sylv.rev1 (Spur 2) und N.sylv.fw1 + N.sylv.rev1 (Spur 4); 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrollen (Spur 3 und 5). Die Auftrennung erfolgte jeweils mittels 1 %igem Agarosegel. Die Größe der erhaltenen Fragmente betrug 424 bp (A) und 824 bp bzw. 737 bp (B: Spur 2 bzw. 4). Bei dem 1000 bp Fragment (B: Spur 2) handelte es sich um ein unspezifisches Nebenprodukt.

3.1.1.3 Komplettierung der 3'- und 5'-Region

Durch die Suche von BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene von *N. suaveolens* konnten die Fragmente 5; 10 und 11 isoliert werden. Sie stimmten in ihren codierenden Regionen überein, unterschieden sich jedoch in den Sequenzen ihrer Introns, weshalb es sich um mindestens zwei unterschiedliche Gene handeln muss. Durch RT-PCR konnte die Expression der theoretisch ermittelten codierenden Sequenz nachgewiesen werden. Sie wurde als N.sua.BSMT2-1 bezeichnet. Da sich die Fragmente 5; 10 und 11 nur in der Sequenz ihrer Introns unterschieden, konnte nicht geklärt werden, auf welches dieser Gene sich die N.sua.BSMT2-1 zurückführen ließ. Um die Substratspezifität dieses BSMT-ähnlichen Enzyms bestimmen zu können war es notwendig, den gesamten codierenden Bereich zu isolieren. Die Isolation der 3'- und 5'UTR-Bereiche sollte mittels 3'RACE und 5'RACE erfolgen. Da die 3'RACE nicht zum Erfolg führte, wurde eine RT-PCR mit aus dem 3'UTR-Bereich der BSMT-ähnlichen Sequenzen von *N. alata* und *N. sylvestris* abgeleiteten Primern durchgeführt. Dabei konnte eine spezifische Bande mit einer Länge von 1110 bp erhalten werden, welche mit der bereits bekannten N.sua.BSMT2-1 Sequenz übereinstimmte und 33 bp der 3'UTR-Region enthielt (Abb. 3.4 B; Spur 2). Die Identifizierung des

5'UTR-Bereichs sollte durch 5'RACE erfolgen. Dabei konnte ein ca. 424 bp großes Fragment isoliert werden (Abb. 3.4 A; Spur 2). Die PCR mit der Primerkombination oligo dT-R2-Mix + alaHRO5'RACE lieferte nur eine sehr schwache Bande, weshalb dieses Fragment nicht weiter bearbeitet wurde (Abb. 3.4 A; Spur 3). Das in Abb. 3.4 A; Spur 2 dargestellte PCR-Fragment wurde aus dem Gel isoliert, mit dem pBluescript Vektor ligiert und in *E. coli* XL1blue Zellen vervielfältigt. Es wurden insgesamt 24 unterschiedliche Klone sequenziert. Von diesen Klonen enthielt nur ein Klon ein Fragment, das mit der gesuchten N.sua.BSMT2-1 Sequenz übereinstimmte. Diese Sequenz brach allerdings schon vor dem gesuchten 5'UTR-Bereich ab. Ein weiterer Klon enthielt eine Sequenz, die inklusive des 5'UTR-Bereiches mit der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 übereinstimmte. Es wurden weiterhin drei unspezifische Sequenzen gefunden, die keine Ähnlichkeit mit den gesuchten BSMT-ähnlichen Sequenzen aufwiesen. Die restlichen 19 Klone enthielten BSMT-ähnliche Sequenzen, die sich jedoch von der gesuchten N.sua.BSMT2-1 Sequenz unterschieden. Allerdings stimmte sie mit der Sequenz des Fragmentes 12 (N.sua.BSMT3-1) überein. Somit konnte die Expression zweier BSMT-ähnlicher Sequenzen zusätzlich zu der schon bekannten N.sua.BSMT1-1 in *N. suaveolens* nachgewiesen werden. Allerdings ist es nicht gelungen den codierenden Bereich, inklusive des 3'- und 5'UTR-Bereichs, für eine dieser Sequenzen vollständig aufzuklären. Durch 5'RACE ist es gelungen 18 bp des 5'UTR-Bereichs des Fragmentes 12 (N.sua.BSMT3-1) zu isolieren, so dass nun eine zusammenhängende Sequenz ab dem Startcodon mit einer Gesamtlänge von 833 bp bekannt ist (siehe 6.3.1.1).

Mittels RT-PCR konnte ab dem Startcodon eine 1197 bp lange Sequenz isoliert werden, die mit der bekannten codierenden Sequenz der Fragmente 10 und 11 (N.sua.BSMT2-1) übereinstimmt. Das gesamte Fragment umfasst inklusive Stoppcodon eine Länge von 1164 bp. Das daraus resultierende Protein hat somit eine Größe von 387 Aminosäuren. Es ist um 32 Aminosäuren länger als die 355 Aminosäuren große blütenspezifische N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens*, zu der sie auf Aminosäureebene eine Identität von 74,1 % aufweist.

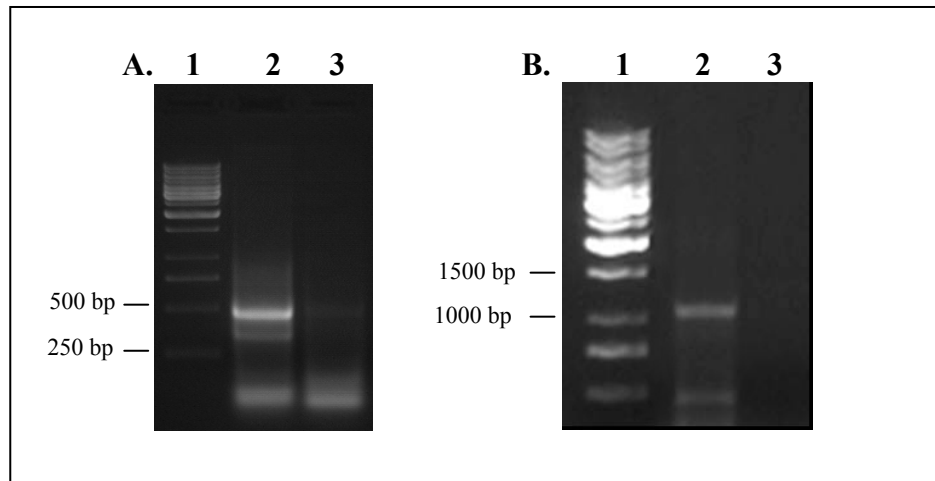


Abbildung 3.4: Suche nach dem 3'- und 5'UTR-Bereich der BSMT-ähnlichen Sequenz der Fragmente 10 und 11 (N.sua.BSMT2-1) aus *N. suaveolens*.

A: Ergebnis der 5'RACE mit der Primerkombination: oligo dT-R2-Mix + alaHRO 5'RACE nested (Spur 2); und oligo dT-R2-Mix + alaHRO 5'RACE (Spur 3); 1000 bp-Marker (Spur 1). Es wurden Fragmente mit der Größe von ca. 424 bp bzw. 465 bp erwartet. **B:** Ergebnis der RT-PCR für die Suche nach dem 3'UTR-Bereich mit der Primerkombination: N.sylv.fw1 + N.alaHRO long rev + N.sylHRO long rev (Spur 2); 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrollen (Spur 3). Die isolierte Bande hatte eine Länge von 1110 bp. Die Auftrennung erfolgte jeweils mittels 1 %igem Agarosegel. Bei der ca. 300 bp Bande (A; Spur 2) handelte es sich um ein unspezifisches Nebenprodukt.

3.1.1.4 Heterologe Expression

Mithilfe der RT-PCR ist es gelungen, den codierenden Bereich inklusive eines kurzen Teils des 3'UTR-Bereichs einer BSMT-ähnlichen Sequenz (N.sua.BSMT2-1) aus *N. suaveolens* zu isolieren. Allerdings gelang es nicht, die 5'UTR-Region der gesuchten Sequenz durch 5'RACE zu ermitteln. Somit besteht noch eine Unsicherheit in den ersten 20 Nukleotiden dieser Sequenz, welche aus der Länge des für die PCR verwendeten Primers (NsBSMTStart FH) resultiert. Trotzdem wurde das Protein überexprimiert, aufgereinigt und anschließend dessen Substratspezifität untersucht.

Die BSMT-ähnliche Sequenz (N.sua.BSMT2-1) wurde durch RT-PCR mit der Primerkombination NsBSMTStart FH + suaHRO1exp vervielfältigt (Abb. 3.5) und anschließend mit dem Überexpressionsvektor pET SUMO (Invitrogen) ligiert. Dieser Vektor versieht das überexprimierte Enzym mit einem N-terminalen ca. 11 kDa großen SUMO-Protein. Dabei handelt es sich um das aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierte Smt3-Protein, welches ein Homolog zu dem SUMO-1 Protein aus Säugetieren darstellt. Mit dessen Hilfe sollte eine erhöhte Löslichkeit des überexprimierten Proteins in *E. coli* erreicht werden (Invitrogen, Instruction manual; Version A, 27 January 2004 25-0709). Zudem enthalten die mithilfe pET SUMO-Vektoren überexprimierten Proteine einen 6 x His-tag, der die Aufreinigung über IMAC ermöglicht.

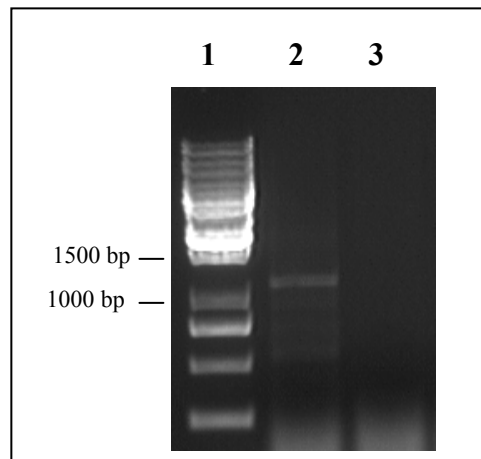


Abbildung 3.5: Amplifizierung der BSMT-ähnlichen Sequenz (N.sua.BSMT2-1) aus *N. suaveolens* für die Ligation mit den pET SUMO-Vektor mittels RT-PCR.

Die RT-PCR wurde mit den Primern NsBSMTStartFH + suaHRO1exp rew durchgeführt. Dabei wurde ein 1164 bp großes Fragment erhalten (Spur 2), welches anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem pET SUMO-Vektor ligiert wurde; 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrollen (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte jeweils mittels 1 %igem Agarosegel.

3.1.1.5 Überexpression der potentiellen BSMT aus *N. suaveolens*

Um zu überprüfen, ob die Überexpression unter den gewählten Bedingungen erfolgreich verlaufen ist, wurden die verwendeten HMS174(DE3) Zellen bzw. BL21(DE3) pSBET-b Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und Aktivitätsbestimmung im *E. coli*-Rohextrakt durchgeführt. Zudem wurden zu den *E. coli*-Flüssigkulturen verschiedene Substrate zugesetzt und die Synthese der entsprechenden methylierten Verbindungen mittels GC-MS Analysen überprüft (siehe 6.4).

Bei den Voruntersuchungen zeigte sich nur bei HMS174(DE3) Zellen, die für 20 h bei 30 °C inkubiert wurden, eine signifikante Enzymaktivität. Somit wurde dieser Stamm unter den entsprechenden Versuchsbedingungen für die anschließende Aufreinigung weiter verwendet. Die Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine erfolgte über Ni-NTA-Säulen. Das Ergebnis der einzelnen Aufreinigungsschritte ist in Abb. 3.6 A dargestellt. Da mit zunehmender Reinheit die Stabilisierung des Proteins immer schwieriger wurde, musste ein Kompromiss zwischen dem Grad der Aufreinigung und der Enzymaktivität gefunden werden. Deshalb erfolgte die Aufreinigung unter wenig stringenten Waschbedingungen, um noch eine möglichst hohe Enzymaktivität zu erreichen. Der Nachweis des überexprimierten Enzyms erfolgte über Westernblotanalyse, mit einem gegen den His-tag gerichteten Antikörper (Abb. 3.6 B). Auf dem Westernblot sind vor allem im zweiten Eluat, zusätzlich zu der Hauptbande bei ca. 60 kDa, noch viele weitere Banden zu erkennen. Dabei könnte es sich um Abbauprodukte handeln. Es ist auch denkbar, dass es sich um unvollständig synthetisierte

Proteine handelt. Das ist deshalb möglich, da sich der His-tag im SUMO-Protein am N-Terminus der BSMT-ähnlichen Sequenz befindet und somit auch alle unvollständig synthetisierten Enzyme aufgereinigt werden. Bei den in den Spuren 3-5 ca. 14 kDa große Proteinbanden handelt es sich um Lysozym, an das der Poly-His-AK gebunden hat.

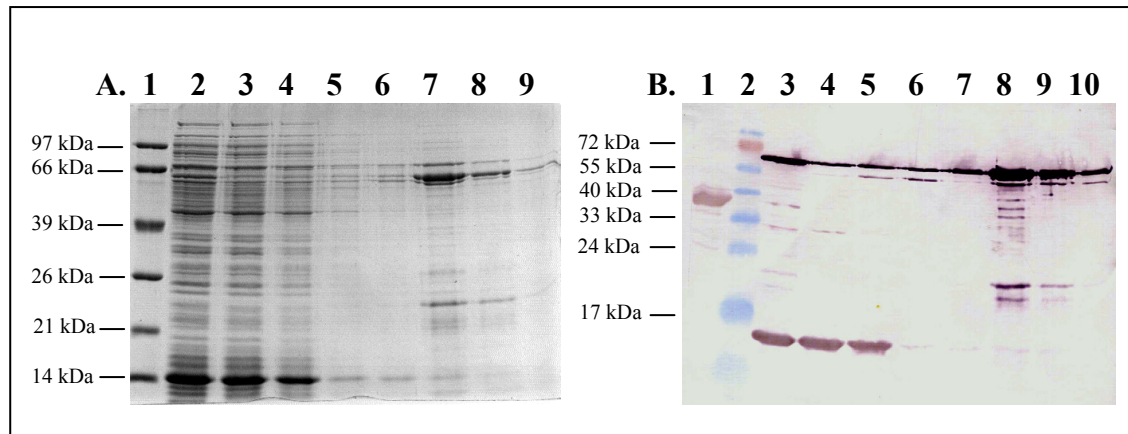


Abbildung 3.6: Aufreinigung und Nachweis der BSMT-ähnlichen Sequenz (N.sua.BSMT2-1) aus *N. suaveolens*.

A: SDS-Gel der verschiedenen Aufreinigungsschritte der BSMT-ähnlichen Sequenz. „Low-Range“ (Roche) Proteingrößenstandard (Spur 1); *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 2); Säulendurchfluß (Spur 3); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 4 und 5); Eluate 1-4 (Spur 6-9). **B:** Westernblot zum Nachweis des überexprimierten Proteins. N.sua.BSMT1-1 (Positivkontrolle), (Spur 1); Proteingrößenstandard (Rothiprestained) (Spur 2); *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 3); Säulendurchfluß (Spur 4); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 5 und 6); Eluate 1-4 (Spur 7-10). Vom Standard wurden jeweils 5 µl und von den Proben 20 µl auf die Gele aufgetragen.

3.1.1.6 Bestimmung der Substratspezifität

In den Voruntersuchungen konnte durch GC-MS Analyse (siehe 6.4) und der Aktivitätsbestimmung im *E. coli*-Rohextrakt erste Rückschlüsse auf die Substratspezifität gezogen werden. Es zeigte sich, dass durch die überexprimierte N.sua.BSMT2-1 Benzoesäure zu Methylbenzoat umgesetzt werden konnte. Um zu überprüfen, welche Verbindungen zudem mögliche Substrate darstellten, wurde ein Enzymtest mit radioaktiv markiertem SAM *in vitro* durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurde das am N-Terminus befindliche SUMO-Protein nicht entfernt. Die Gründe dafür lagen einerseits an einer hohen Instabilität des aufgereinigten Enzyms, so dass längere Inkubationszeiten bei Temperaturen über 4 °C verstärkt zu Aktivitätsverlusten führten. Diese wären aber für den Verdau mittels SUMO-Protease notwendig gewesen. Weiterhin kam es schon durch die Zugabe des für die Proteolyse benötigten Puffers zu irreversiblen Aktivitätsverlusten. Ein dritter Grund war, dass das Protein im Proteolyseansatz stark verdünnt worden wäre. Da die Enzymaktivität aber relativ gering war, hätte es nach dem Verdau wieder aufkonzentriert werden müssen. Dagegen sprach wiederum die geringe

Stabilität des Enzyms (siehe auch: Krohn, 2007). Entsprechende Probleme traten auch bei allen anderen mittels SUMO-Vektor überexprimierten Proteinen auf. Deshalb wurde das SUMO-Protein auch bei allen anderen aufgereinigten Enzymen nicht entfernt. Welchen möglichen Einfluss der SUMO-tag auf das Enzym haben könnte, wird in der Diskussion betrachtet. Alle Testreihen wurden immer mit möglichst frisch isoliertem Enzym durchgeführt.

Wie aus Abb. 3.7 hervorgeht, stellte Benzoesäure mit einer relativen Enzymaktivität von 81,89 % und einer maximal erreichten Enzymaktivität von 6,43 pkat/mg Protein, neben der 2-Methoxy-Benzoesäure (100 %; 7,43 pkat/mg Protein), das am effektivsten umgesetzte Substrat dar. Weiterhin wurden Salizylsäure (20,65 %; 1,65 pkat/mg Protein) und Anthranilsäure (18,27 %; 1,38 pkat/mg Protein) von der potentiellen BSMT (N.sua.BSMT2-1) umgesetzt. Alle weiteren Substrate wurden mit einer relativen Enzymaktivität von 5 % und darunter genutzt. Somit konnte durch die *in vitro* Enzymtests gezeigt werden, dass das heterolog überexprimierte Enzym der neu isolierten BSMT-ähnlichen Sequenz in der Lage ist, Benzoesäure und Salizylsäure umzusetzen. Zudem weist es eine hohe Sequenzähnlichkeit mit der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* auf (74,1 %). Deshalb wird auch im weiteren Verlauf bei diesem Enzym von der „N.sua.BSMT2-1“ gesprochen.

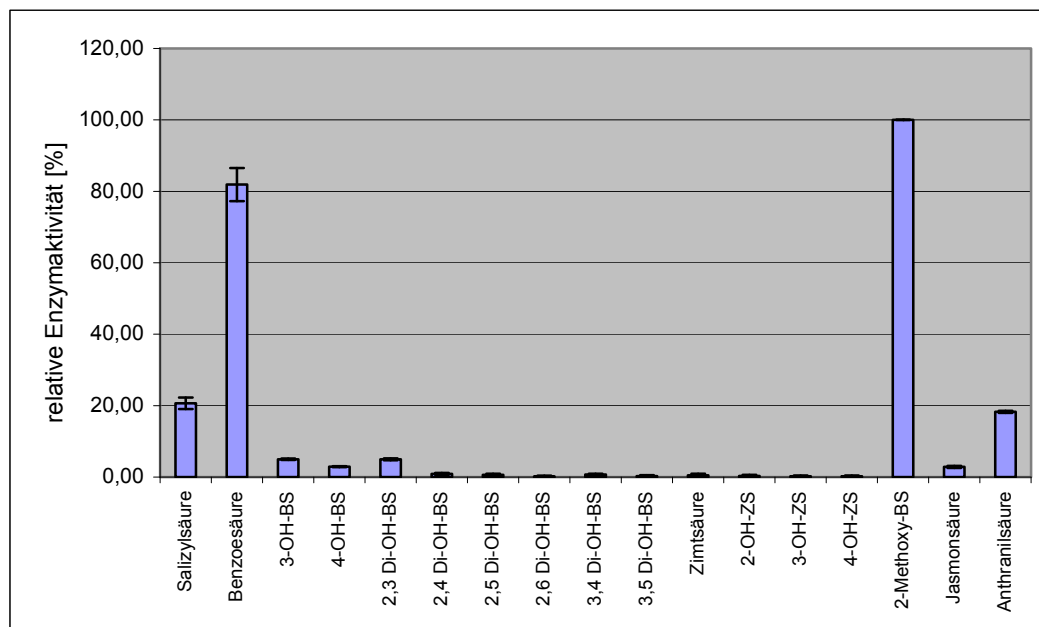


Abbildung 3.7: Substratspezifität der N.sua.BSMT2-1 aus *N.suaveolens*.

Die mit 2-Methoxy-Benzoesäure ermittelte Enzymaktivität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu berechnet. Die Untersuchungen wurden mit Tris/HCl-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Es wurden 2 unabhängige Testreihen mit Doppelansätzen durchgeführt. Die relative Abweichung vom Mittelwert ist angegeben. Die für 2-Methoxy-Benzoesäure maximal erreichte Enzymaktivität betrug 7,43 pkat/mg Protein. Es wurden etwa 3,5 µg Enzym pro Reaktionsansatz eingesetzt.

3.1.2 N.sua.BSMT1-2

Neben der Sequenz der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 konnte mithilfe der RT-PCR aus Blüten von *N. suaveolens* eine weitere Sequenz isoliert werden, die als N.sua.BSMT1-2 (alt: „BSMT2“) bezeichnet wurde (Hippauf, 2004). Es wurde untersucht, ob die gefundene Sequenz exprimiert wird oder ob es sich möglicherweise um eine genomische Kontamination handeln könnte. Dies wäre durchaus möglich, da ein entsprechendes Fragment (Fragment 8; siehe 3.1.1.1) ohne Introns auf genomischer Ebene isoliert werden konnte. Des Weiteren wurde überprüft, ob die isolierte Sequenz für ein funktionsfähiges Protein codiert. Für die Überprüfung der Expression wurde eine 3'RACE durchgeführt. Für die Aktivitätsuntersuchungen wurde auf den Klon 40 zurückgegriffen, in welchem die N.sua.BSMT1-2 bereits im pET 101/D-TOPO Vektor vorlag (Hippauf, 2004). Die Aktivitätsuntersuchungen erfolgten nach der Überexpression mittels GC-MS Analyse und durch radioaktive Enzymtests.

3.1.2.1 3'RACE

Für die 3'RACE wurde aus Blüten isolierte RNA verwendet. Wie aus Abb. 3.8 ersichtlich, konnte ein etwa 600 bp großes Fragment erhalten werden. Insgesamt wurden 14 unterschiedliche Klone sequenziert. Dabei konnte aber nur der bereits bekannte 3'UTR-Bereich der blütenspezifische N.sua.BSMT1-1 nachgewiesen werden. Somit bleibt weiterhin unklar, ob die N.sua.BSMT1-2 Sequenz exprimiert wird.

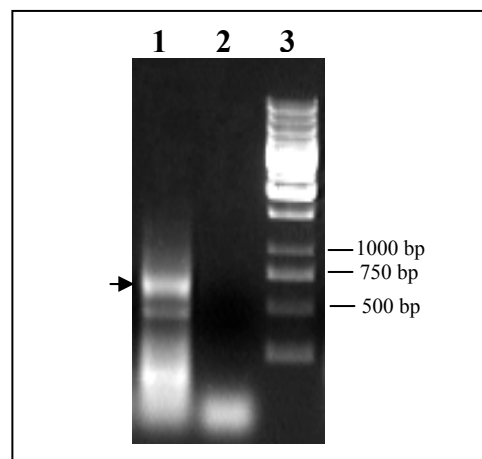


Abbildung 3.8: Suche nach dem 3'UTR-Bereich der N.sua.BSMT1-2 aus *N. suaveolens*.

Durch 3'RACE und anschließender PCR mit den Primern NsBAMT int5 fw und oligo dT-R2-Mix wurde eine ca. 600 bp Bande erhalten (Pfeil). Das etwa 400 bp große Fragment, entsprach nicht der erwarteten Größe und stellte sich als ein unspezifisches Amplifikat heraus.

3.1.2.2 Überexpression der N.sua.BSMT1-2 aus *N. suaveolens*

Um zu überprüfen, ob die aus Blüten isolierte N.sua.BSMT1-2 Sequenz für ein aktives Enzym kodiert, wurde sie in den Überexpressionsvektor pET 101/D-TOPO integriert und anschließend in HMS174(DE3) Zellen für 20 h bei 20 °C überexprimiert. Die N.sua.BSMT1-2 lag bereits zu Beginn der Arbeit im pET 101/D-TOPO Vektor vor und konnte direkt für die Überexpressionsuntersuchungen eingesetzt werden (Hippauf, 2004). Das Ergebnis der Aufreinigung ist in Abb. 3.9 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Protein mit der erwarteten Größe von ca. 43 kDa gebildet und aufgereinigt werden konnte.

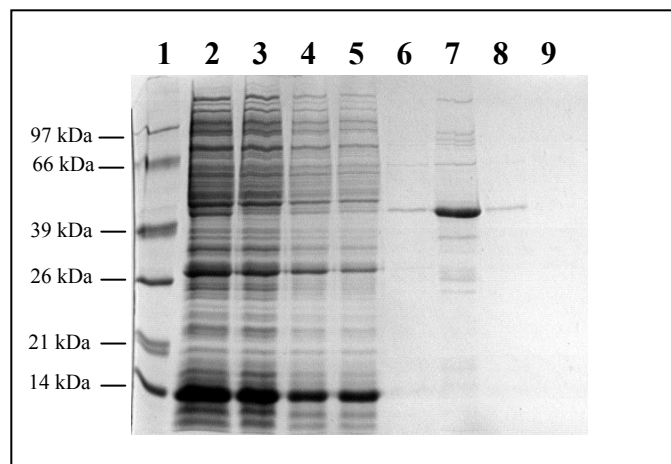


Abbildung 3.9: Aufreinigung der N.sua.BSMT1-2 von *N. suaveolens*.

SDS-Gel der verschiedenen Aufreinigungsschritte der N.sua.BSMT1-2. „Low-Range“ (Roche) Proteingrößenstandard (Spur 1); *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 2); Säulendurchfluß (Spur 3); 1. und 2. Waschen mit je 20 mM Imidazol (Spur 4 und 5); Eluate 1-4 (Spur 6-9). Die höchste Konzentration der N.sua.BSMT1-2 wurde im 2. Eluat (Spur 7) erreicht, welches deshalb im weiteren Verlauf für Enzymtests eingesetzt wurde. Vom Standard wurden jeweils 5 µl und von den Proben 20 µl auf die Gele aufgetragen.

3.1.2.3 Bestimmung der Substratspezifität

Die Bestimmung der Substrataktivität erfolgte durch einen radioaktiven Enzymtest, bei dem die radioaktiv markierte Methylgruppe des SAM auf die Carboxylgruppe des verwendeten Substrats übertragen werden sollte.

Bei den Untersuchungen konnte weder im *E. coli*-Rohextrakt noch in der aufgereinigten N.sua.BSMT1-2 Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dabei wurden alle unter 2.2.20.1 genannten Substrate getestet.

3.1.3 Potentielle SAMT

3.1.3.1 Suche potentieller SAMT in *N. suaveolens*

Von Todd Barkman (Western Michigan University) wurden unvollständige potentielle SAMT-Sequenzen von *N. alata* (N.ala.SAMT1) und *N. sylvestris* (N.syl.SAMT1) zur Verfügung gestellt. Durch RT-PCR wurde untersucht, ob entsprechende Sequenzen auch in *N. suaveolens* exprimiert werden. Da bereits für einzelne SAMTs die Induzierbarkeit der Expression durch Salizylsäure gezeigt werden konnte, wurden Blätter vor der RNA-Isolation in 5 mM Salizylsäure inkubiert. Wie in Abb. 3.10 zu erkennen, konnte die Expression eines ca. 1000 bp Fragments nachgewiesen werden. Die anschließende Sequenzierung zeigte, dass auf Proteinebene eine Identität von 93,3 % zu den potentiellen SAMTs aus *N. alata* und *N. sylvestris* bestand.

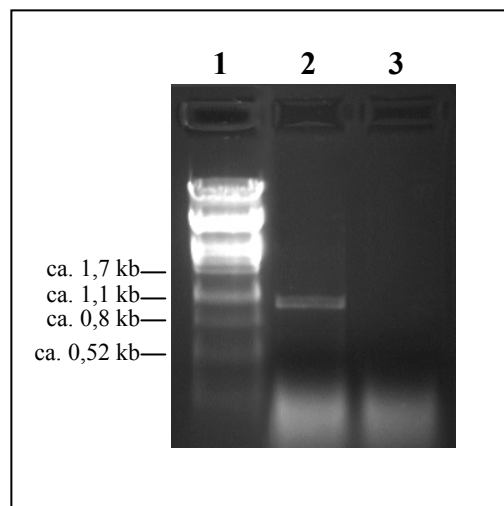


Abbildung 3.10: Suche nach einer potentiellen SAMT in *N. suaveolens* (N.sua.SAMT1).

Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination: N.ala HRO expr fw und N.ala HRO expr rev (Spur 2); Längenstandard, λ -DNA *Pst* I verdaut (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte durch ein 1 %iges Agarosegel. Die Größe des erhaltenen Fragments betrug 1077 bp.

3.1.3.2 Komplettierung der 3'- und 5'-Region

Für die Überexpression der potentiellen SAMT (N.sua.SAMT1) war es notwendig, Kenntnis über den gesamten codierenden Bereich zu erlangen. Mittels RT-PCR, mit aus dem 5'UTR-Bereich der SAMT von *N. tabacum* (N.tab.SAMT1) abgeleiteten Primern, sollten Teile der 5'UTR-Region erhalten werden (Abb. 3.11 A). Dabei wurde ein ca. 500 bp großes Fragment erhalten, welches mit der gesuchten N.sua.SAMT1 Sequenz übereinstimmte und abzüglich der 28 bp langen Primersequenz 43 bp des 5'UTR-Bereichs enthielt. Die Identifizierung des 3'UTR-Bereichs mithilfe der 3'RACE lieferte ein ca. 750 bp großes Fragment (Abb. 3.11 B).

Dieses Fragment stimmte mit der gesuchten Sequenz überein und enthielt den 167 bp langen 3'UTR-Bereich. Somit weist der codierende Bereich der *N.sua.SAMT1* eine Länge von 1077 bp auf, das einer Proteinlänge von 358 Aminosäuren entspricht.

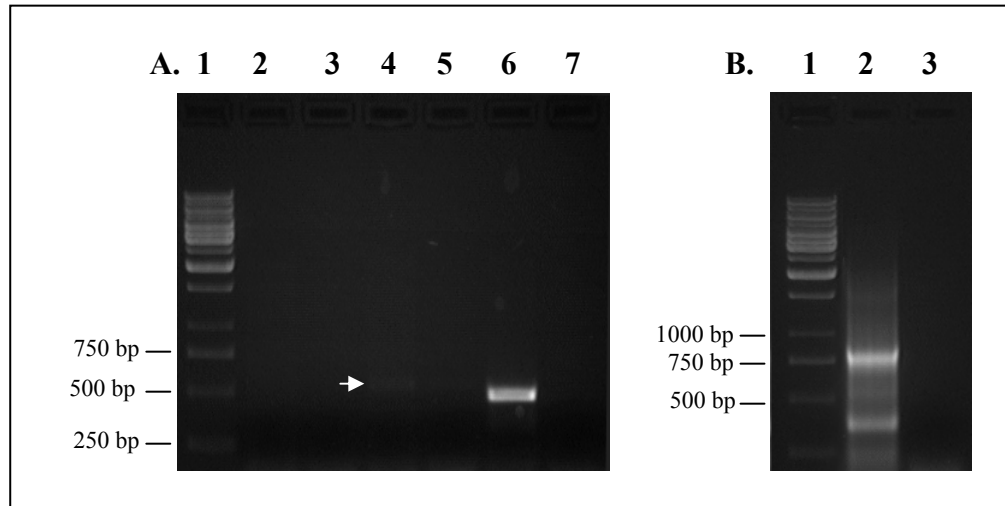


Abbildung 3.11: Suche nach dem 5'- und 3'UTR-Bereich der *N.sua.SAMT1* aus *N. suaveolens*.

A: Isolation des 5'UTR-Bereichs durch RT-PCR. Mit der Primerkombination *N.tab* 5'UTR2 und *N.sua* 5'RACE (Spur 4, Pfeil) wurde ein ca. 500 bp großes Fragment erhalten, welches aus dem Gel eluiert und später sequenziert wurde. Die PCR mit der Primerkombination *N.tab* 5'UTR und *N.sua* 5'RACE (Spur 2) führte nicht zum Erfolg; Negativkontrollen (Spur 3; 5 und 7); Mit der Primerkombination: *N.ala* HRO expr fw und *N.sua* 5'RACE wurde ein 479 bp Fragment erhalten (Positivkontrolle, Spur 6); 1000 bp-Marker (Spur 1). **B:** Ergebnis der 3'RACE. Mit der Primerkombination: *N.sua* 3'RACE und R2 (Spur 2) wurde ein ca. 750 bp Fragment erhalten, das den gesuchten 3'UTR-Bereich enthielt; 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte jeweils mittels 1 %igem Agarosegel.

3.1.3.3 Heterologe Expression

Durch RT-PCR und 3'RACE konnte der gesamte codierende Bereich der *N.sua.SAMT1* aus *N. suaveolens* isoliert werden. Für die Überexpression war es notwendig, diese zuvor in einen Überexpressionsvektor zu integrieren. Als Überexpressionsvektor wurde der pET 101/D-TOPO Vektor gewählt. Dieser versieht das überexprimierte Protein mit einem C-terminalen 6 x Histidin-Rest, über den das Enzym anschließend aufgereinigt werden kann. Da aber die Überexpression der *N.sua.SAMT1* mit dem pET 101/D-TOPO Vektor nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde sie zudem in den pET SUMO Vektor (Invitrogen) integriert. In Abb. 3.12 sind die Ergebnisse der RT-PCRs dargestellt. In beiden Fällen konnte ein Fragment erhalten werden. Nach der Integration der *N.sua.SAMT1* Sequenz in die Überexpressionsvektoren, wurden diese durch Chemotransformation stabil in TOP10 Zellen integriert und die Sequenzen anschließend durch Sequenzierung überprüft.

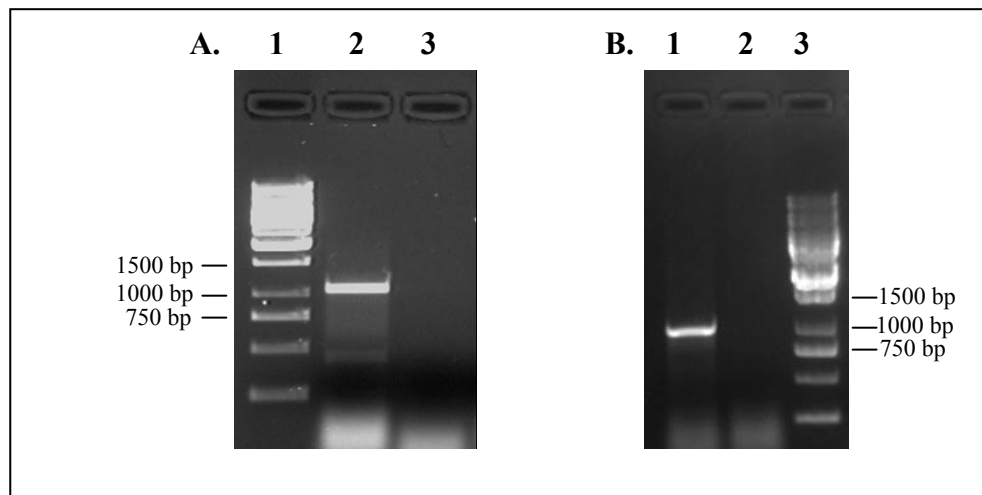


Abbildung 3.12: Amplifizierung der N.sua.SAMT1 Sequenz aus *N. suaveolens* für die Ligation mit den pET 101/D-TOPO und pET SUMO-Vektor mittels RT-PCR.

A: Die RT-PCR wurde mit den Primern N.syl exp fw + sua exp rev durchgeführt. Dabei wurde ein 1078 bp großes Fragment erhalten (Spur 2), das anschließend aus dem Gel ausgeschnitten in den pET 101/D-TOPO Vektor integriert wurde; 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrollen (Spur 3). **B:** Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination sylSAMTexfw + suaSAMTexprev. Es wurde ein 1077 bp großes Fragment erhalten (Spur 1), welches anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem pET SUMO-Vektor ligiert wurde; 1000 bp Marker (Spur 3); Negativkontrollen (Spur 2). Die Auftrennung erfolgte jeweils mittels 1 %igem Agarosegel.

Aufgrund der unterschiedlichen Vektorsysteme war die Länge der erhaltenen Fragmente nicht identisch.

3.1.3.4 Überexpression der N.sua.SAMT1 aus *N. suaveolens*

Für die Überexpression wurden der pET 101/D-TOPO Vektor und der pET SUMO Vektor verwendet. Der Grund dafür bestand darin, dass die Menge der mittels pET 101/D-TOPO Vektor gebildeten N.sua.SAMT1 nicht für Expressionsuntersuchungen ausreichend war. Die Voruntersuchungen zeigten, dass HMS174(DE3) Zellen, die bei 20 °C bzw. 30 °C für 20 h inkubiert wurden, hohe Enzymaktivitäten mit Salizylsäure als Substrat aufwiesen (siehe 6.4.1). Da die im *E. coli*-Rohextrakt gemessene Enzymaktivität für die bei 20 °C inkubierten Zellen jedoch noch deutlich höher war als bei 30 °C, wurde diese Temperatur für die weiteren Überexpressionen gewählt. Die Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine erfolgte über Ni-NTA-Säulen. Abb. 3.13 zeigt, dass die N.sua.SAMT1 überexprimiert und anschließend aufgereinigt werden konnte. Das Ergebnis der einzelnen Aufreinigungsschritte ist in Abb. 3.13 A dargestellt. Abbildung 3.13 B zeigt den Nachweis des überexprimierten Enzyms durch Westernblotanalyse, mittels eines gegen den His-tag gerichteten Antikörpers. Auf dem Westernblot sind vor allem im zweiten Eluat zusätzlich zu der Hauptbande bei ca. 55 kDa noch viele weitere Banden, die vermutlich Abbauprodukte oder unvollständig

synthetisierte Proteine darstellen, zu erkennen. Bei den in den Spuren 3-5 zu erkennenden ca. 14 kDa großen Proteinbanden handelt es sich um Lysozym, an welches der Poly-His-AK gebunden hat.

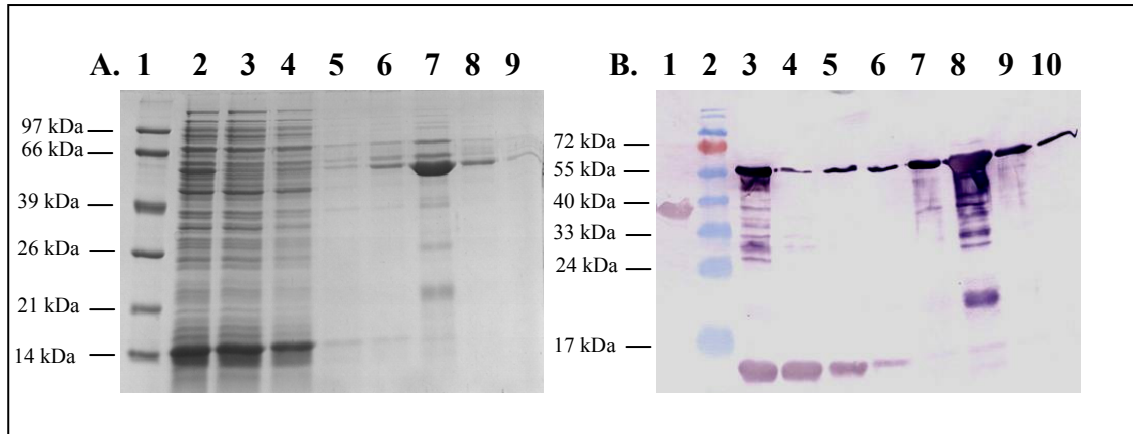


Abbildung 3.13: Aufreinigung und Nachweis der N.sua.SAMT1 aus *N. suaveolens*.

A: SDS-Gel der verschiedenen Aufreinigungsschritte der N.sua.SAMT1. „Low-Range“ (Roche) Proteingrößenstandard (Spur 1); *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 2); Säulendurchfluß (Spur 3); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 4 und 5); Eluate 1-4 (Spur 6-9). **B:** Westernblot zum Nachweis des überexprimierten Proteins. N.sua.BSMT1-1 (Positivkontrolle), (Spur 1); Proteingrößenstandard (Rothiprestained) (Spur 2); *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 3); Säulendurchfluß (Spur 4); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 5 und 6); Eluate 1-4 (Spur 7-10). Vom Standard wurden jeweils 5 µl und von den Proben 20 µl auf die Gele aufgetragen.

3.1.3.5 Bestimmung der Substratspezifität

Die Ermittlung der Substratspezifität erfolgte mithilfe eines radioaktiven Enzymtests. Die höchste Enzymaktivität wurde mit Salizylsäure erreicht (ca. 116 pkat/mg Enzym). Diese Aktivität wurde 100 % gesetzt und alle anderen relativ dazu berechnet (Abb. 3.14). Im Vergleich zur Salizylsäure wurde mit Benzoesäure nur eine relative Enzymaktivität von 5,26 % (ca. 8 pkat/mg Enzym) erreicht. Neben diesen beiden Verbindungen wurden vor allem an ortho-Position hydroxylierte Substrate umgesetzt. Dabei handelte es sich um 2,3-Dihydroxybenzoesäure (21,67 %), 2,4-Dihydroxybenzoesäure (3,15 %) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (14,7 %).

Aufgrund der Enzymaktivität und der Sequenz, die eine hohe Ähnlichkeit zu schon bekannten SAMTs besitzen (je ca. 82 % zu der SAMT aus *Datura wrightii* bzw. *Atropa belladonna*), kann bei diesem Enzym von einer SAMT gesprochen werden. Deshalb wird sie im weiteren Verlauf als „N.sua.SAMT1“ bezeichnet.

Neben der Überexpression der N.sua.SAMT1 im pET SUMO Vektor wurde auch der pET101/D-TOPO Vektor verwendet. Allerdings konnte hier so gut wie kein aktives Protein isoliert werden. Es ist lediglich einmal gelungen, ausreichend Protein für die Bestimmung der Substratspezifität zu gewinnen. Die höchste Enzymaktivität wurde wiederum mit Salizylsäure

erreicht (100 %; 0,55 pkat/mg Enzym). Benzoesäure wurde verglichen mit Salizylsäure mit einer relativen Enzymaktivität von 3,94 % (0,02 pkat/mg Enzym) umgesetzt. Die erreichten Aktivitäten mit 2,3-Dihydroxybenzoesäure und die 2,5-Dihydroxybenzoesäure lagen bei 15,5 % und 13,28 %. Die relativen Enzymaktivitäten sind vergleichbar mit denen der mittels pET SUMO Vektor überexprimierten *N.sua.SAMT1*. Daraus wird deutlich, dass das SUMO-Protein in diesem Fall die Substratspezifität nicht beeinträchtigt.

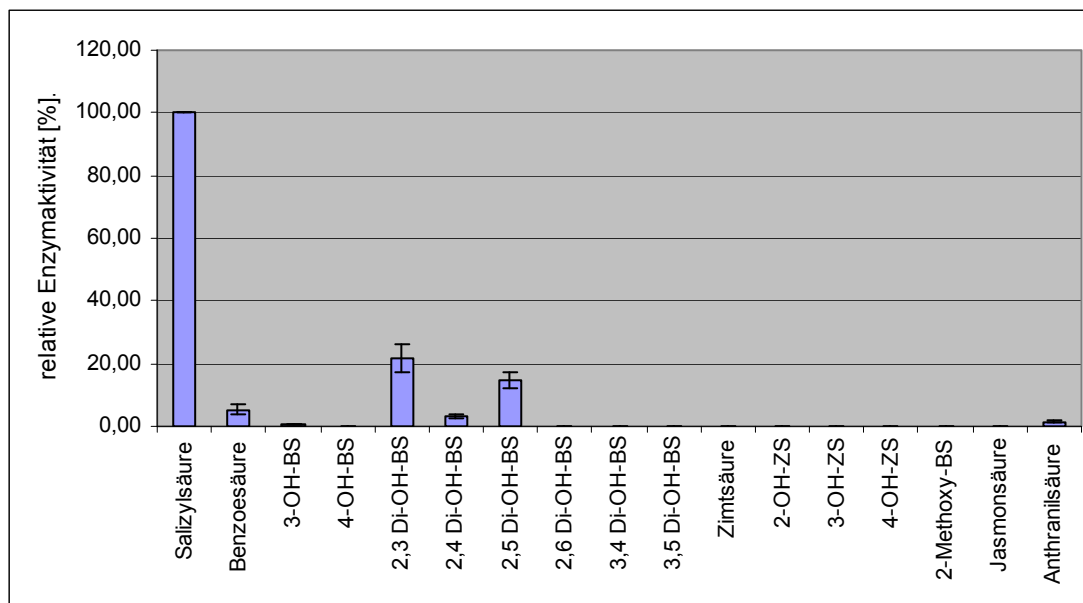


Abbildung 3.14: Substratspezifität der *N.sua.SAMT1* aus *N. suaveolens*.

Die mit Salizylsäure ermittelte Enzymaktivität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu berechnet. Die Untersuchungen wurden mit Tris/HCl-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Es wurden 2 unabhängige Testreihen mit Doppelansätzen durchgeführt. Die relative Abweichung vom Mittelwert ist angegeben. Die für Salizylsäure maximal erreichte Enzymaktivität betrug 116 pkat/mg Protein. Es wurden etwa 3 µg Enzym pro Reaktionsansatz eingesetzt.

3.2 *N. alata*

3.2.1 Potentielle BSMT

3.2.1.1 Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene

Bei der Suche von BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene von *N. alata* konnte ein 1169 bp großes Fragment erhalten werden (Abb. 3.15). Dieses Fragment enthielt 2 Introns mit einer Länge von 329 bp und 604 bp. Das erste Intron begann wie in den Fragmenten 4; 6; 10 und 11 (Abb. 3.1) an Position 487. Es besaß keine größeren Sequenzübereinstimmungen mit diesen Introns. Allerdings gab es kurze übereinstimmende Bereiche direkt an der Exon-Intron-Grenze mit den Introns der Fragmente 10 und 11 (siehe 6.3.2.2.1). Der Startpunkt des zweiten Introns befindet sich bezogen auf die *N.sua.BSMT1-1* aus *N. suaveolens* an Position

741. In diesem Bereich lässt sich auch der Startpunkt des zweiten Introns der Fragmente 10 und 11 vermuten.

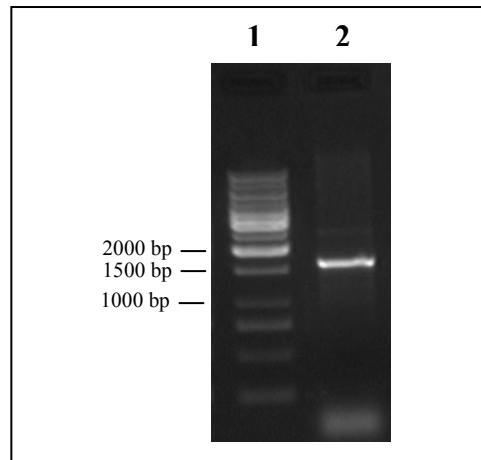


Abbildung 3.15: Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen in *N. alata*.

Mit der Primerkombination N.sylv.fw1 + N.sylv.rev1 wurde ein 1169 bp großes Fragment erhalten (Spur 2), welches hohe Ähnlichkeit zur blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* zeigte. Das Fragment enthielt 2 Introns mit einer Länge von 329 bp und 604 bp; 1000 bp Marker (Spur 1). Die Auftrennung erfolgte mittels 1 %igem Agarosegel.

Der codierende Bereich der isolierten Fragmente stimmt mit der nachfolgend beschriebenen N.ala.BSMT2-1 überein.

3.2.1.2 Expressionsüberprüfung

Durch RT-PCR wurde untersucht, ob die auf genomischer Ebene gefundene Sequenz in *N. alata* exprimiert wird. Dabei wurde ein ca. 700 bp großes Fragment erhalten, das mit dem codierenden Bereich der genomischen Sequenz übereinstimmte (Abb. 3.16).

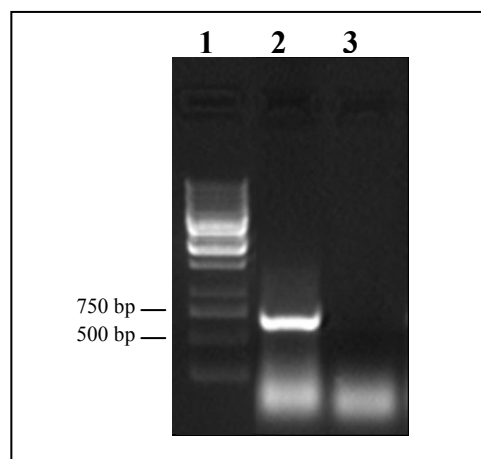


Abbildung 3.16: Expressionsüberprüfung der potentiellen BSMT (N.ala.BSMT2-1) aus *N. alata*.

Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination: N.sylv.fw1 + N.sylv.rev1 (Spur 2); 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte mittels 1 %igem Agarosegel. Die Größe des erhaltenen Fragments betrug 737 bp.

3.2.1.3 Komplettierung der 3'- und 5'-Region

Anhand von RT-PCRs konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine BSMT-ähnliche Sequenz (N.ala.BSMT2-1) in *N. alata* exprimiert wird. Um jedoch das Protein überexprimieren zu können, war die Kenntnis des gesamten codierenden Bereichs erforderlich. Die Vervollständigung des codierenden Bereichs erfolgte mithilfe der 5'- und 3'RACE. Die 5'RACE wurde mit den Primerkombinationen oligo dT-R2-Mix + alaHRO 5'RACE nested bzw. oligo dT-R2-Mix + alaHRO 5'RACE durchgeführt, wobei beide Ansätze ein ca. 500 bp großes Fragment lieferten (Abb. 3.17 A). Das Fragment, das durch die PCR mit der ersten Primerkombination amplifiziert werden konnte (Abb. 3.17 A; Spur 2), wurde aus dem Gel eluiert und mit dem pBluescript Vektor ligiert. Dieser Ligationsansatz wurde anschließend für eine Chemotransformation von XL1blue Zellen verwendet. Die Sequenzierung des ca. 500 bp Fragments zeigte, dass es mit der gesuchten Sequenz übereinstimmte und neben dem fehlenden codierenden Bereich noch 43 bp der 5'UTR-Region enthielt.

Mittels 3'RACE konnte ein ca. 800 bp großes Fragment erhalten werden, das ebenfalls mit der gesuchten Sequenz übereinstimmte und zudem 135 bp des 3'UTR-Bereichs enthielt (Abb. 3.17 B). Durch die 5'- und die 3'RACE war es möglich, den gesamten codierenden Bereich der N.ala.BSMT2-1 zu erhalten. Inklusive Stoppcodon hat der codierende Bereich eine Länge von 1164 bp, welches einer Proteinlänge von 387 Aminosäuren entspricht. Somit besitzt die N.ala.BSMT2-1 aus *N. alata* die gleiche Größe wie die N.sua.BSMT2-1, zu der sie auf Aminosäureebene eine Identität von 86,3 % aufweist. Mit der N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* ist es zu 74,1 % identisch.

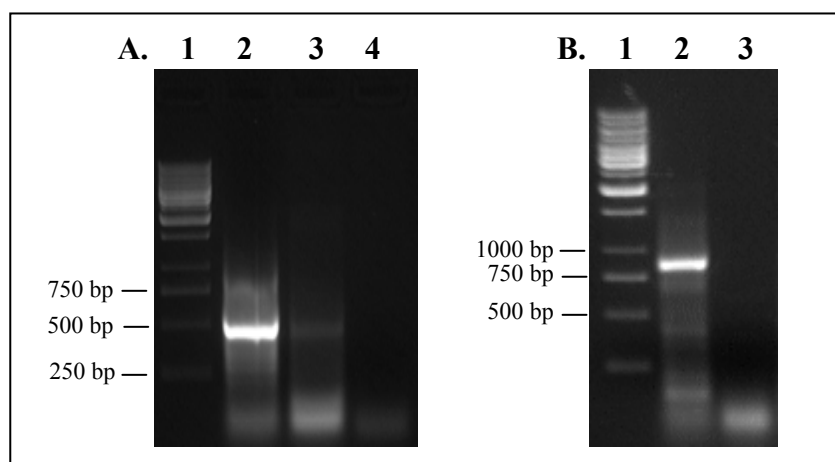


Abbildung 3.17: Suche nach dem 5'- und 3'UTR-Bereich der N.ala.BSMT2-1 aus *N. alata*.

A: Isolation des 5'UTR-Bereichs durch 5'RACE. Mit der Primerkombination: oligo dT-R2-Mix + alaHRO 5'RACE nested (Spur 2) wurde ein ca. 500 bp großes Fragment erhalten, welches aus dem Gel eluiert und später sequenziert wurde; Primerkombination oligo dT-R2-Mix + alaHRO 5'RACE (Spur 3); Negativkontrolle (Spur 4); 1000 bp-Marker (Spur 1). **B:** Ergebnis der 3'RACE. Mit der Primerkombination: N.sylRACE1fwFH und R2 (Spur 2) wurde ein ca 800 bp Fragment erhalten, das den gesuchten 3'UTR-Bereich enthielt; 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte jeweils mittels 1 %igem Agarosegel.

3.2.1.4 Heterologe Expression

Für die Überexpression musste die *N.ala.BSMT2-1* in einen Überexpressionsvektor integriert werden. Durch RT-PCR erfolgte die Amplifizierung der Sequenz inklusive Stoppcodon (Abb. 3.18). Neben der oberen Bande sind noch mehrere unspezifische Fragmente amplifiziert worden. Das Fragment mit der erwarteten Größe wurde aus dem Agarosegel eluiert und mit dem pET SUMO Vektor ligiert. Mittels Sequenzierung wurde anschließend eine Sequenz gesucht, welche keine Fehler aufgrund von Basenaustauschen, die während der cDNA Synthese oder der PCR aufgetreten sind, aufwies.

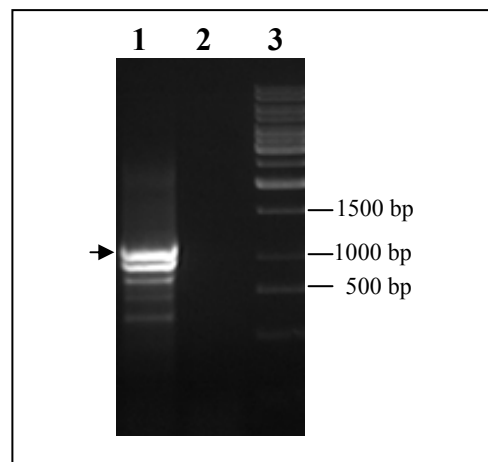


Abbildung 3.18: Amplifizierung der *N.ala.BSMT2-1* aus *N. alata* für die Ligation mit dem pET SUMO Vektor mittels RT-PCR.

Die RT-PCR wurde mit den Primern *alaHROexpfw2* + *alaHROexprev2* durchgeführt. Dabei wurde ein 1178 bp großes Fragment erhalten (Spur 1, Pfeil), das anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und in den pET SUMO Vektor integriert wurde; 1000 bp Marker (Spur 3); Negativkontrollen (Spur 2). Die Auftrennung erfolgte durch ein 1 %iges Agarosegel.

3.2.1.5 Überexpression der *N.ala.BSMT2-1* aus *N. alata*

Für die Überexpression wurde der pET SUMO Vektor verwendet. Die Voruntersuchungen zeigten das HMS174(DE3) Zellen, welche bei 20 °C für 20 h inkubiert wurden, Enzymaktivitäten mit Benzoesäure als Substrat aufwiesen. Die Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine erfolgte über Ni-NTA-Säulen. Abb. 3.19 zeigt, dass die ca. 60 kDa große potentielle BSMT (inklusive SUMO-Protein) überexprimiert und anschließend aufgereinigt werden konnte. Die Überprüfung der Aufreinigung erfolgte zudem durch Westernblotanalyse. Das überexprimierte Enzym wurde mit Hilfe eines gegen die *N.sua.BSMT1-1* aus *N. suaveolens* gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Das zweite Eluat, das mit ca. 0,5 µg/µl Protein die größte Konzentration der *N.ala.BSMT2-1* zeigte, wurde für die Untersuchung der Substratspezifität eingesetzt.

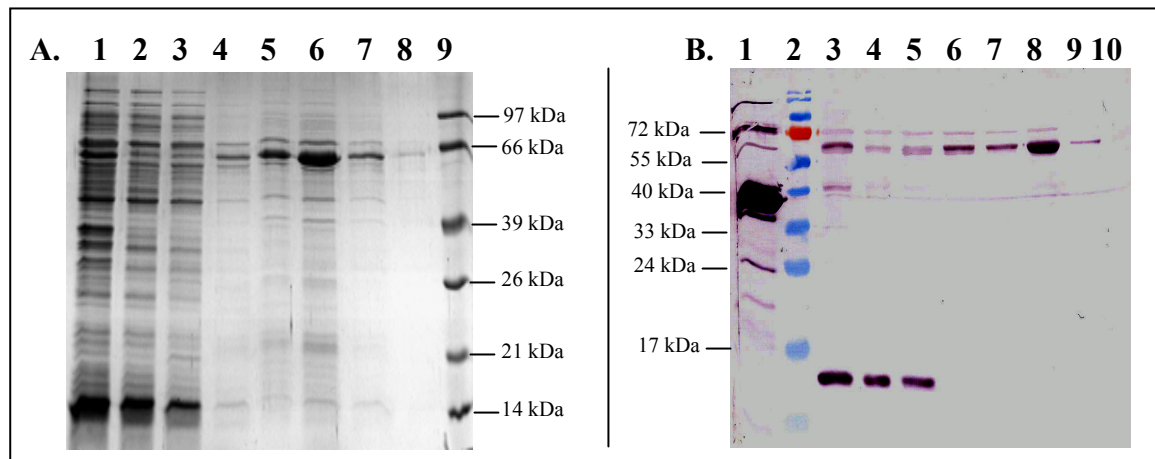


Abbildung 3.19: Aufreinigung und Nachweis der N.ala.BSMT2-1 aus *N. alata*.

A: SDS-Gel der verschiedenen Aufreinigungsschritte der potentiellen BSMT. *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 1); Säulendurchfluß (Spur 2); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 3 und 4); Eluate 1-4 (Spur 5-8); „Low-Range“ (Roche) Proteingrößenstandard (Spur 9). **B:** Westernblot zum Nachweis des überexprimierten Proteins mittels N.sua.BSMT1-1 Antikörper. N.sua.BSMT1-1 (Positivkontrolle), (Spur 1); Proteingrößenstandard (Rothi-Prestained), (Spur 2); *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 3); Säulendurchfluß (Spur 4); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 5 und 6); Eluate 1-4 (Spur 7-10). Vom Standard wurden jeweils 5 µl und von den Proben 20 µl auf die Gele aufgetragen.

3.2.1.6 Bestimmung der Substratspezifität

Für die Bestimmung der Substratspezifität wurden zum Reaktionsansatz neben dem Enzym und dem zu testenden Substrat radioaktiv markiertes SAM hinzugegeben. Durch die Reaktion wurde die radioaktive Methylgruppe des SAM auf die Carboxylgruppe des zu testenden Substrates übertragen. Die Menge an umgesetztem Substrat wurde durch Szintillationsmessung bestimmt. Die höchste Enzymaktivität wurde mit 2-Methoxy-Benzoesäure erreicht und betrug 3,54 pkat/mg Enzym. Diese Enzymaktivität wurde 100 % gesetzt und alle anderen relativ dazu berechnet (Abb. 3.20). Neben 2-Methoxy-Benzoesäure wurde Benzoesäure mit einer relativen Enzymaktivität von 66,18 % +/- 13,03 % (max. 1,88 pkat/mg Enzym) als zweitbestes Substrat umgesetzt. Daneben stellten nur noch Anthranilsäure mit 26,21 % (max. 0,9 pkat/mg Enzym) und Salizylsäure mit 13,47 % (max. 0,38 pkat/mg Enzym) gute Substrate dar. Alle anderen getesteten Verbindungen wurden mit relativen Aktivitäten unter 5 % umgesetzt.

Durch die durchgeführten *in vitro* Enzymtests konnte gezeigt werden, dass das heterolog überexprimierte Enzym der neu isolierten BSMT-ähnlichen Sequenz in der Lage ist, Benzoesäure, Salizylsäure und 2-Methoxy-Benzoesäure umzusetzen. Bisher ist noch unklar, ob 2-Methoxy-Benzoesäure in *N. alata* als Substrat *in planta* überhaupt zu Verfügung steht. Deshalb wird im weiteren Verlauf bei diesem Enzym von der „N.ala.BSMT2-1“ gesprochen.

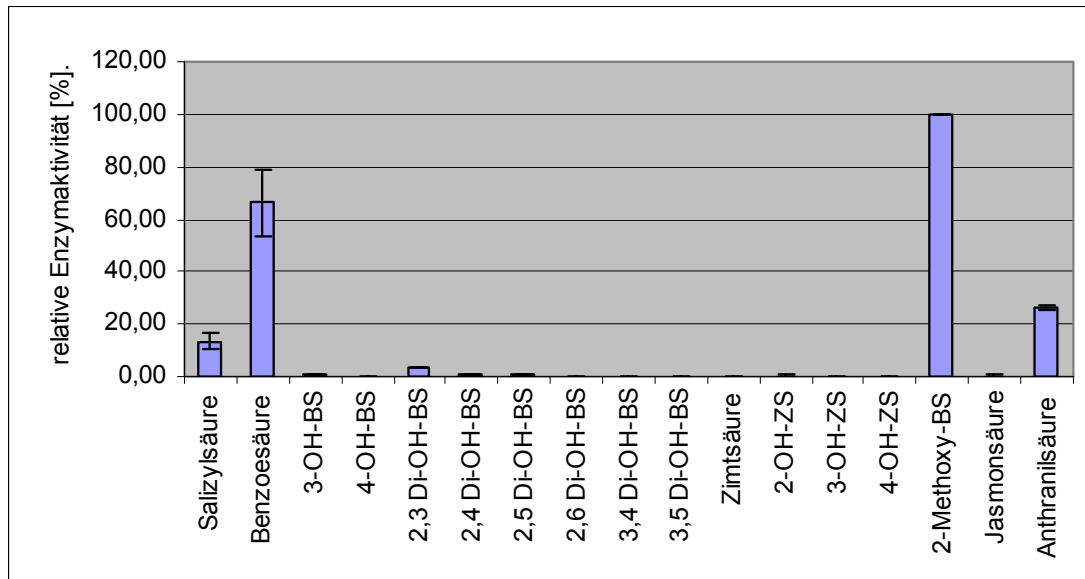


Abbildung 3.20: Substratspezifität der N.ala.BSMT2-1 aus *N. alata*.

Die mit 2-Methoxy-Benzoessäure ermittelte Enzymaktivität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu berechnet. Die Untersuchungen wurden mit Tris/HCl-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Es wurden 2 unabhängige Testreihen mit Doppelansätzen durchgeführt. Die relative Abweichung vom Mittelwert ist angegeben. Die für 2-Methoxy-Benzoessäure maximal erreichte Enzymaktivität betrug 3,54 pkat/mg Protein. Es wurden etwa 5 µg Enzym pro Reaktionsansatz eingesetzt.

3.2.1.7 Expressionsuntersuchungen

Der „steady state Gehalt“ an N.ala.BSMT2-1 sollte mithilfe der RT-PCR untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie sehr sensitiv ist und auch noch geringste Mengen an vorhandenem Transkript nachweisbar sind. Um eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen RT-PCRs zu gewährleisten, wurden gleiche Mengen an Gesamt-RNA für die RT-Reaktionen eingesetzt und der Transkriptions-Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) als externer Standard verwendet. Die für die Untersuchungen verwendete RNA stammte aus verschiedenen Organen (Blatt, Wurzel, Spross, Blüte), die zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden. Aus Abb. 3.21 ist ersichtlich, dass die N.ala.BSMT2-1 mRNA in allen Organen außer in der Wurzel nachgewiesen werden konnte. Zudem ist der „steady-state Gehalt“ der N.ala.BSMT2-1 mRNA zu allen Zeitpunkten etwa gleich, was auf eine kontinuierliche Expression hindeutet.

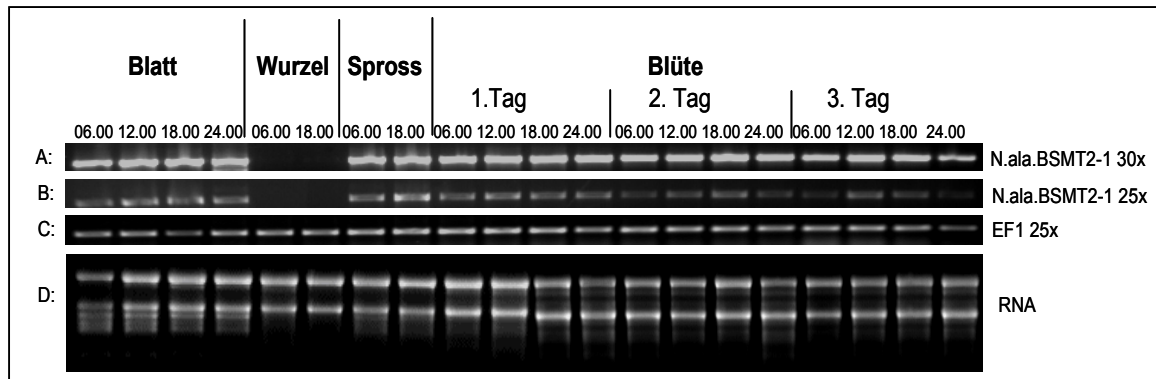


Abbildung 3.21: Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der N.ala.BSMT2-1 aus *N. alata* mittels RT-PCR.

Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA Synthesen eingesetzt (Spur D). Zudem erfolgte eine Standardisierung durch EF1 α . Die Zyclenzahl der PCR betrug 25 (Spur C). Nach dieser Zyclenzahl war noch keine Sättigung erreicht. Die Expression der N.ala.BSMT2-1 konnte außer in Wurzeln in allen Organen und zu allen Erntezeitpunkten nachgewiesen werden (Spur A und B). Es wurden unabhängige PCRs mit 25 Zyklen (Spur B) und mit 30 Zyklen (Spur A) durchgeführt, um zu zeigen, dass noch keine Sättigung erreicht war. Über der Spur A sind die jeweiligen Erntezeitpunkte und die entsprechenden Organe aufgetragen. Bei den Blüten wurde zusätzlich das Blütenalter erwähnt.

3.2.1.8 Regulation der N.ala.BSMT2-1 Expression

Um weitere Einblicke in die Expression der N.ala.BSMT2-1 zu gewinnen, wurde eine mögliche Regulation durch Salizylsäure bzw. Benzoessäure untersucht. Der Grund dafür lag in der Annahme, dass die N.ala.BSMT2-1 eine Funktion in der Pathogenantwort der Pflanze besitzen könnte. Für diese Untersuchungen wurden ca. 1 x 1 cm große Blattstücke für 24 h in 5 mM Salizylsäure bzw. Benzoessäure inkubiert und anschließend die Expression der N.ala.BSMT2-1 mit in Wasser inkubierten Blattstücken verglichen. Um zu untersuchen, ob nicht schon durch das Schneiden der Blätter Veränderungen in der Genexpression auftraten, wurden zu Beginn der Behandlung Blattproben genommen und aus diesen die Gesamt-RNA isoliert. Wie in Abb. 3.22 I und II zu erkennen, nahm die Menge an vorhandener N.ala.BSMT2-1 mRNA schon durch das Schneiden der Blätter deutlich ab. Zudem ist eine Abnahme nach Inkubation der Blätter in Salizylsäure (Abb. 3.22 I; Spur 3) und in Benzoessäure (Abb. 3.22 II; Spur 3) zu erkennen. Diese ist allerdings etwas geringer, als die der geschnittenen und in Wasser inkubierten Blattstücke. Somit scheint die Expression der N.ala.BSMT2-1 schon durch Verletzungen der Blätter verringert zu werden. Möglicherweise wird die Expression durch Salizylsäure und Benzoessäure induziert, so dass dieser Effekt der Verringerung der Expression durch die Verletzung entgegenwirkt und die Expression wieder etwas erhöht wird, aber dennoch unter der unverletzter Blätter liegt.

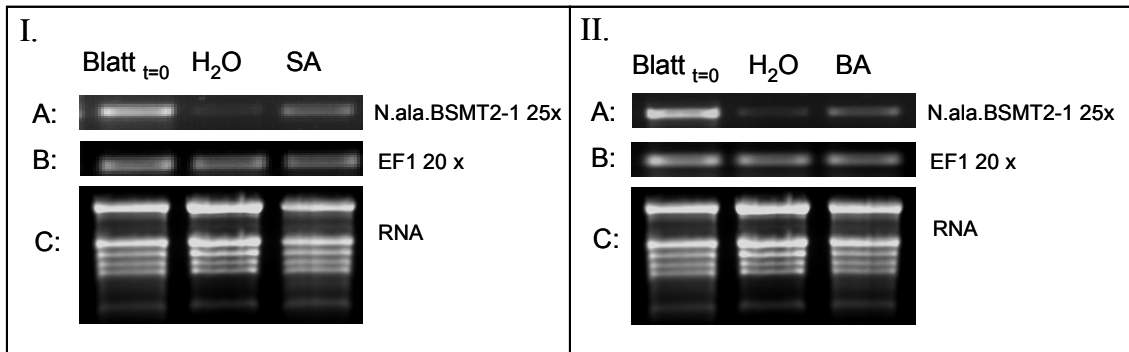


Abbildung 3.22: Untersuchung der Induzierbarkeit der *N.ala.BSMT2-1* durch Salizylsäure bzw. Benzoessäure.

Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA Synthesen eingesetzt (I und II, C). Zudem erfolgte eine Standardisierung mittels EF1 α . Die Zyklenzahl der PCR betrug 20 (I und II, B). Nach dieser Zyklenzahl war noch keine Sättigung erreicht. **I:** Untersuchung der Induzierbarkeit der *N.ala.BSMT2-1* mittels 5 mM Salizylsäure (Spur A). **II:** Untersuchung der Induzierbarkeit der *N.ala.BSMT2-1* mittels 5 mM Benzoessäure (Spur A)

Die Zyklenzahl der PCR für den Nachweis der *N.ala.BSMT2-1* betrug 25, da nach dieser Zyklenzahl noch keine Sättigung erreicht war. Über Spur A ist jeweils die Behandlung der Proben erkennbar (Blatt $t=0$: zum Zeitpunkt $t=0$ geerntete Blätter; H₂O: in Wasser inkubiert Blattstücke; SA: in 5 mM Salizylsäure inkubierte Blattstücke; BA: in 5 mM Benzoessäure inkubierte Blattstücke).

3.2.2 Potentielle *N.ala.SAMT*

3.2.2.1 Expressionsnachweis

Von Todd Barkman (Western Michigan University) wurde die Teilsequenz einer potentiellen SAMT zur Verfügung gestellt (*N.ala.SAMT1*). Durch RT-PCR mit aus Blättern isolierter Gesamt-RNA wurde deren Expression überprüft. Dabei konnte ein ca. 1000 bp großes Fragment amplifiziert werden, das mit der gesuchten Sequenz übereinstimmte (Abb. 3.23).

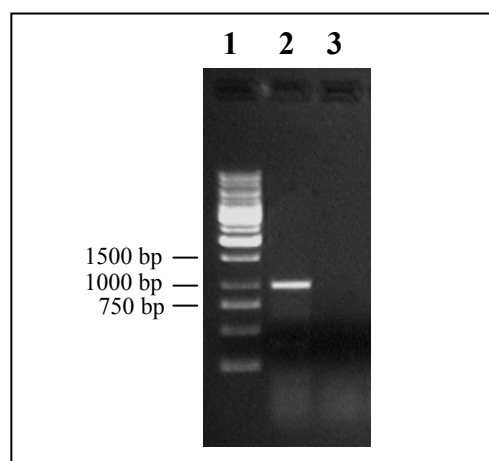


Abbildung 3.23: Expressionsüberprüfung der *N.ala.SAMT1* aus *N. alata*.

Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination: *Nala fw1* + *Nala rew1* (Spur 2); 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte mittels 1 %igem Agarosegel. Die Größe des erhaltenen Fragments betrug 1026 bp.

3.2.2.2 Komplettierung der 3'- und 5'-Region

Die Expression der potentiellen SAMT in *N. alata* (N.ala.SAMT1) konnte durch RT-PCR nachgewiesen werden. Die Komplettierung dieser Sequenz sollte durch 5'- und 3'RACE erfolgen. Da die 5'RACE zunächst erfolglos blieb, wurden Primer aus dem 5'UTR-Bereich der N.tab.SAMT1 von *N. tabacum* abgeleitet (Martins und Barkman, 2005). Diese wurden zusammen mit Primern aus der bereits bekannten codierenden Region der N.ala.SAMT1 für die Identifizierung der noch fehlenden Bereiche durch RT-PCR, eingesetzt. In Abb. 3.24 A ist zu erkennen, dass auf diese Weise ein ca. 600 bp großes Fragment erhalten wurde, das die gesuchte codierende Sequenz inklusive 42 bp der 5'UTR-Region umfasste. Die Suche der 3'UTR-Region erfolgte mittels 3'RACE. Dabei konnte ein ca. 750 bp großes Fragment erhalten werden. Dieses Fragment umfasste neben der fehlenden codierenden Region den kompletten 3'UTR-Bereich mit einer Länge von 322 bp (Abb. 3.24 B). Aufgrund dieser Untersuchungen konnte der gesamte codierende Bereich der N.ala.SAMT1 ermittelt werden. Er umfasst inklusive Stoppcodon 1077 bp, welches einer Länge von 358 Aminosäuren entspricht.

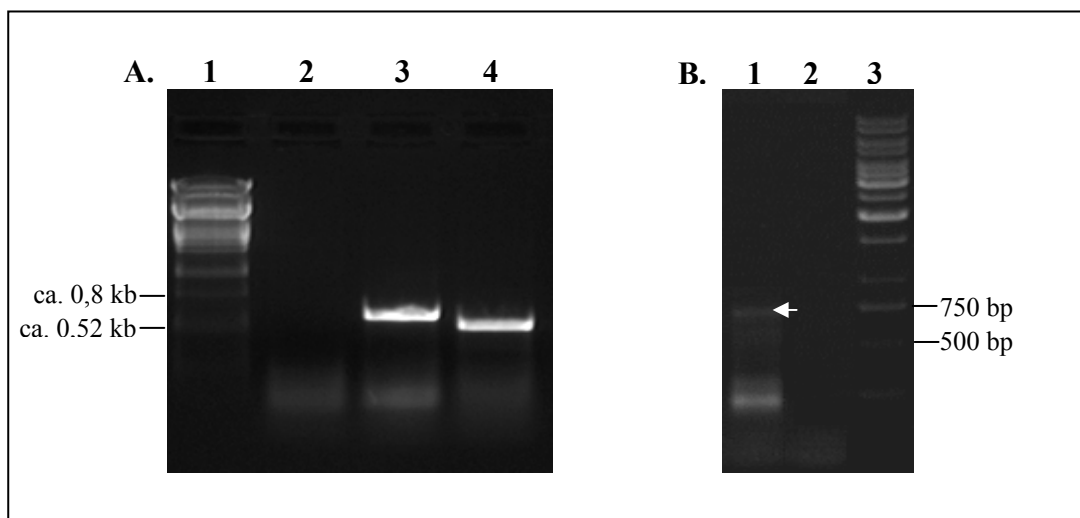


Abbildung 3.24: Identifizierung des 5'- und 3'UTR-Bereichs der N.ala.SAMT1 aus *N. alata*.

A: Isolation des 5'UTR-Bereichs mithilfe der RT-PCR. Mit der Primerkombination N.tab 5'UTR und N.ala 5'RACE nested (Spur 3) wurde ein ca. 600 bp großes Fragment erhalten, welches aus dem Gel eluiert und später sequenziert wurde. Die PCR mit der Primerkombination N.tab 5'UTR und N.ala 5'RACE nested (Spur 2) führte nicht zum Erfolg; Mit der Primerkombination: N.ala fw1 und N.ala 5'RACE nested wurde ein ca. 500 bp Fragment erhalten (Positivkontrolle, Spur 4); Längenstandard, λ DNA *Pst* I verdaut (Spur 1). **B:** Ergebnis der 3'RACE. Mit der Primerkombination: N.ala 3'RACE und R2 (Spur 1) wurde ein ca 750 bp Fragment erhalten (Pfeil), welches den gesuchten 3'UTR Bereich enthielt; 1000 bp Marker (Spur 3); Negativkontrolle (Spur 2). Die Auftrennung erfolgte jeweils mittels 1 %igem Agarosegel.

3.2.2.3 Heterologe Expression

Die große Ähnlichkeit der isolierten Sequenz aus *N. alata* (N.ala.SAMT1) zu der N.tab.SAMT1 aus *N. tabacum*, sowie die Übereinstimmung wichtiger Substratbindestellen ließ vermuten, dass durch die isolierten Sequenz ebenfalls eine SAMT codiert wird. Um diese Vermutung zu untermauern und Einzelheiten über die Substratspezifität zu erhalten, sollte die N.ala.SAMT1 in *E. coli* überexprimiert und anschließend über immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) mittels Ni-NTA Säulen aufgereinigt werden. Für die Überexpression wurde der pET 101/D-TOPO Vektor verwendet. Wie aus Abb. 3.25 ersichtlich, konnte durch die RT-PCR ein etwa 1100 bp großes Fragment erhalten werden, welches aus dem Gel eluiert und anschließend in den pET 101/D-TOPO Vektor integriert wurde. Neben der oberen Bande sind noch mehrere unspezifische Fragmente amplifiziert worden. Diese Fragmente resultierten aus den für die Klonierung in den pET 101/D-TOPO Vektor vorgegebenen Primersequenzen und konnten auch unter veränderten PCR-Bedingungen nicht vermieden werden.

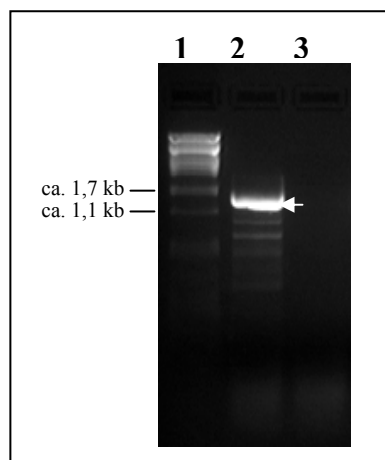


Abbildung 3.25: RT-PCR Fragment des komplettierten codierenden Bereichs der N.ala.SAMT1 aus *N. alata*.

Mithilfe der RT-Reaktion und anschließender PCR mit der Primerkombination N.syl exp fw und N.syl exp rev wurde ein dominantes Fragment einer Größe von 1078 bp synthetisiert (Spur 2, Pfeil) und anschließend mittels Gelelektion aus dem 1%igen Agarosegel isoliert. Bei den zusätzlich amplifizierten Fragmenten handelte es sich um unspezifische Produkte. Negativkontrolle (Spur 3); Längenstandard, λ DNA *Pst* I verdaut (Spur 1).

3.2.2.4 Überexpression der N.ala.SAMT1 aus *N. alata*

Anhand der Voruntersuchungen mittels GC-MS Analyse und Aktivitätsbestimmungen der *E. coli*-Rohextrakte ist es gelungen, geeignete Bedingungen für die Überexpression der N.ala.SAMT1 zu finden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde sie im weiteren Verlauf immer mit HMS174(DE3) Zellen bei 20 °C bei einer Inkubationszeit von ca. 20 h durchgeführt. Die Aufreinigung der N.ala.SAMT1 erfolgte durch IMAC. Die einzelnen Aufreinigungsschritte sind in Abb. 3.26 anhand eines SDS-Gels dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die ca. 42 kDa große N.ala.SAMT1 (inklusive His-tag) überexprimiert und anschließend aufgereinigt werden konnte. Das zweite Eluat, das mit ca. 0,5 µg/µl die größte Konzentration der N.ala.SAMT1 zeigte, wurde für die Untersuchung der Substratspezifität eingesetzt.

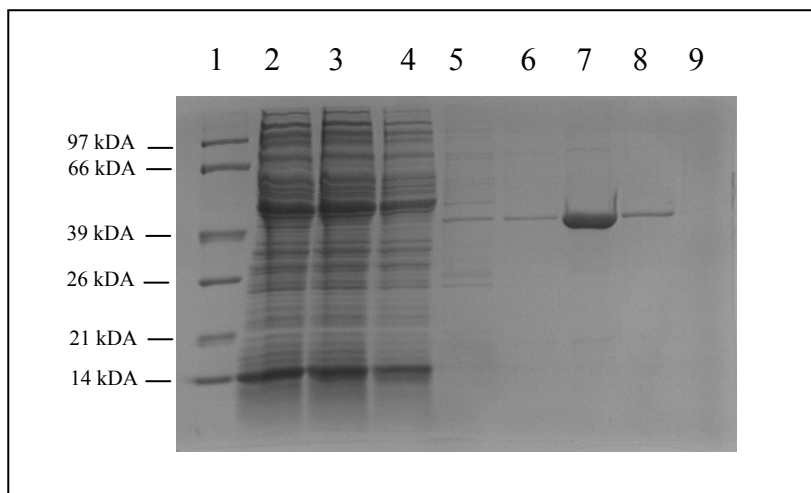


Abbildung 3.26: Aufreinigung der N.ala.SAMT1 aus *N. alata*.

SDS-Gel der verschiedenen Aufreinigungsschritte der N.ala.SAMT1. *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 2); Säulendurchfluß (Spur 3); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 4 und 5); Eluate 1-4 (Spur 6-9); „Low-Range“ (Roche) Proteingrößenstandard (Spur 1). Vom Standard wurden jeweils 5 µl und von den Proben 20 µl auf die Gele aufgetragen.

3.2.2.5 Bestimmung der Substratspezifität

Nachdem es gelungen war die N.ala.SAMT1 zu überexprimieren und aufzureinigen, wurde deren Substratspezifität bestimmt. Die höchste Enzymaktivität zeigte sich mit Salizylsäure als Substrat (max. 2,3 pkat/mg Enzym). Diese Enzymaktivität wurde 100 % gesetzt und alle anderen relativ dazu berechnet (Abb. 3.27). Des Weiteren wurden 2,3-Dihydroxybenzoesäure mit 52,54 % (max. 1,25 pkat/mg Enzym), 2,4-Dihydroxybenzoesäure mit 21,94 % (max. 0,7 pkat/mg Enzym) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure mit 61,27 % (max. 1,66 pkat/mg Enzym) als Substrate akzeptiert. Neben der Salizylsäure konnte auch die Benzoesäure mit 37,82 % +/- 7,22 % (max. 1,05 pkat/mg Enzym) umgesetzt werden. Daneben wurde nur noch die 3-Hydroxybenzoesäure (7,95 %) mit einer relativen Enzymaktivität über 5 % verwendet.

Im Vergleich der Substratspezifitäten der N.sua.SAMT1 und der N.ala.SAMT1 ergibt sich ein ähnliches Bild, obwohl die N.sua.SAMT1 spezifischer für Salizylsäure ist. Deshalb wird die N.ala.SAMT1 trotz einer relativen Enzymaktivität von 37,82 % +/- 7,22 % mit Benzoesäure, aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität zu den bereits isolierten SAMTs und der hohen Ähnlichkeit ihres Substratspektrums mit der N.sua.SAMT1 im weiteren Verlauf nicht als BSMT, sondern als „N.ala.SAMT1“ bezeichnet.

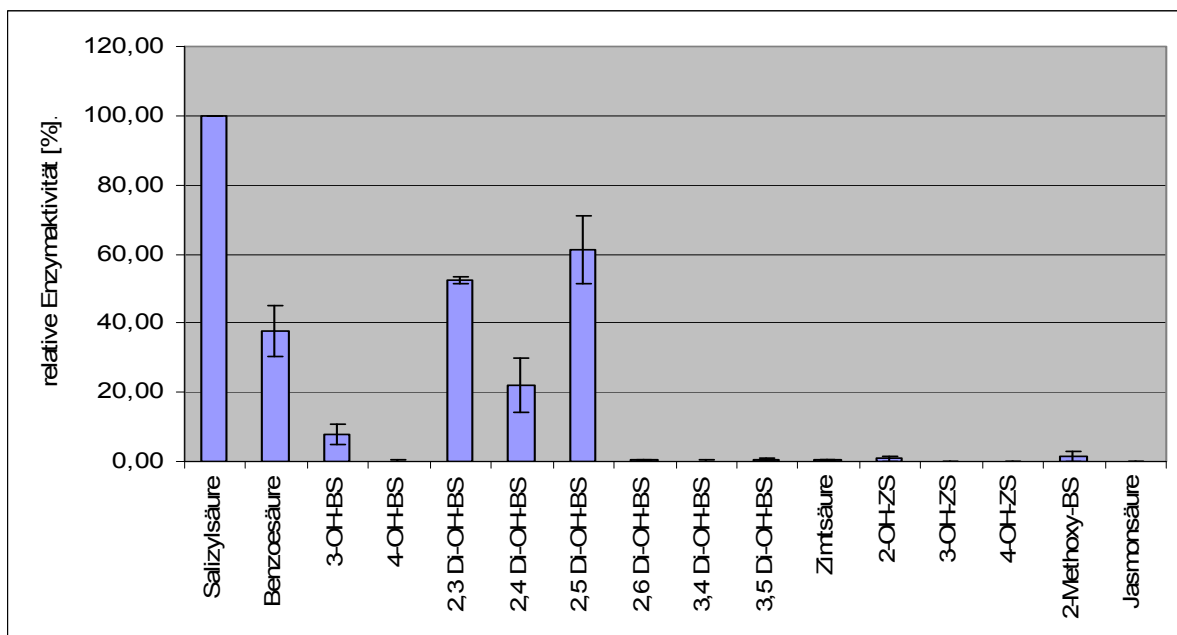


Abbildung 3.27: Substratspezifität der N.ala.SAMT1 aus *N. alata*.

Die mit Salizylsäure ermittelte Enzymaktivität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu berechnet. Die Untersuchungen wurden mit Tris/HCl-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Es wurden 2 unabhängige Testreihen mit Doppelansätzen durchgeführt. Die relative Abweichung vom Mittelwert ist angegeben. Die für Salizylsäure maximal erreichte Enzymaktivität betrug 2,3 pkat/mg Protein. Es wurden etwa 5 µg Enzym pro Reaktionsansatz eingesetzt.

3.2.2.6 Expressionsuntersuchungen

Die N.ala.SAMT1 konnte mithilfe der RT-PCR in allen Geweben und zu allen Erntezeitpunkten nachgewiesen werden, allerdings war die Quantität sehr verschieden. Zudem scheint der „steady-state Gehalt“ an N.ala.SAMT1 mRNA unter Normalbedingungen sehr gering zu sein, da erst nach 35 PCR-Zyklen erste Fragmente sichtbar waren (Abb. 3.28, Spur B). Die Schwankungen in der Quantität der N.ala.SAMT1 mRNA lassen vermuten, dass deren Expression circadian reguliert sein könnte, wobei die mRNA-Menge bis ca. 12.00 Uhr anzusteigen scheint, um danach wieder abzufallen und gegen 24.00 Uhr einen Tiefpunkt zu erreichen. Da der entsprechende Versuch aber nur einmal durchgeführt wurde, müsste er noch einmal wiederholt werden, um die Ergebnisse zu verifizieren.

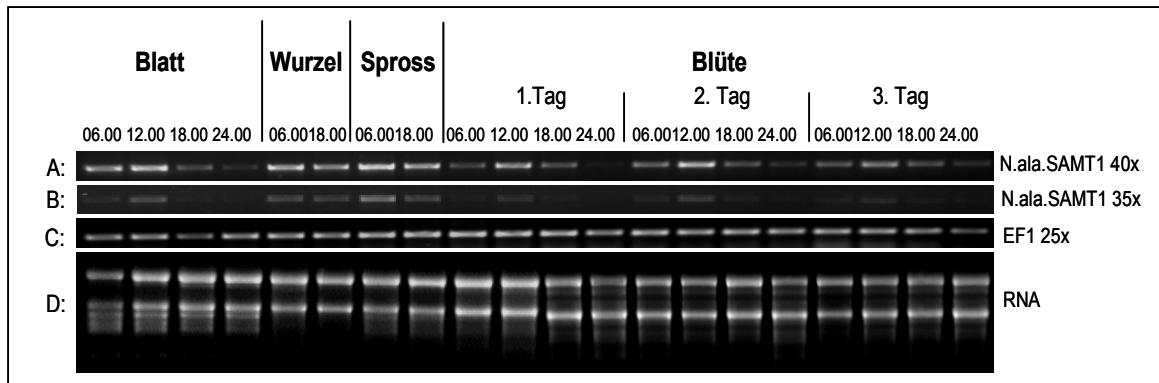


Abbildung 3.28: Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der *N.ala.SAMT1* aus *N. alata* mittels RT-PCR.

Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA Synthesen eingesetzt (Spur D). Zudem erfolgte eine Standardisierung durch EF1 α . Die Zyclenzahl der PCR betrug 25 (Spur C). Nach dieser Zyclenzahl war noch keine Sättigung erreicht. Die Expression der *N.ala.SAMT1* konnte in allen Organen und zu allen Erntezeitpunkten nachgewiesen werden (Spur A und B). Es wurden unabhängige PCRs mit 35 Zyklen (Spur B) und mit 40 Zyklen (Spur A) durchgeführt, um zu zeigen, dass noch keine Sättigung erreicht war. Über der Spur A sind die jeweiligen Erntezeitpunkte und die entsprechenden Organe aufgetragen. Bei den Blüten wurde zusätzlich das Blütenalter erwähnt.

3.2.2.7 Regulation der *N.ala.SAMT1* Expression

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die *N.ala.SAMT1* in allen Organen und zu allen Zeitpunkten exprimiert wird, wurde untersucht, ob sich dessen Expression durch Zugabe von 5 mM Salizylsäure bzw. Benzoesäure verändert. In Abb. 3.29 I ist zu erkennen, dass die Expression der *N.ala.SAMT1* schon durch das Schneiden der Blätter geringfügig erhöht wird. Zu einer deutlichen Induktion kam es jedoch in den mit Salizylsäure inkubierten Blattstücken (Abb. 3.29 I). Auch in Abb. 3.29 II ist wieder eine erhöhte Transkriptmenge in den in Wasser inkubierten Blattstücken im Vergleich zum Zeitpunkt $t=0$ nachgewiesen worden. Allerdings kam es zu keiner deutlichen Veränderung der vorhandenen Transkriptmenge durch die Inkubation der Blattstücke mittels Benzoesäure. Das legt nahe, dass es durch die Erhöhung der Benzoesäurekonzentration zu keiner Induktion der Expression, sondern möglicherweise sogar zu einer Inhibition der Expression oder einem erhöhtem Abbau der *N.ala.SAMT1* mRNA kommt.

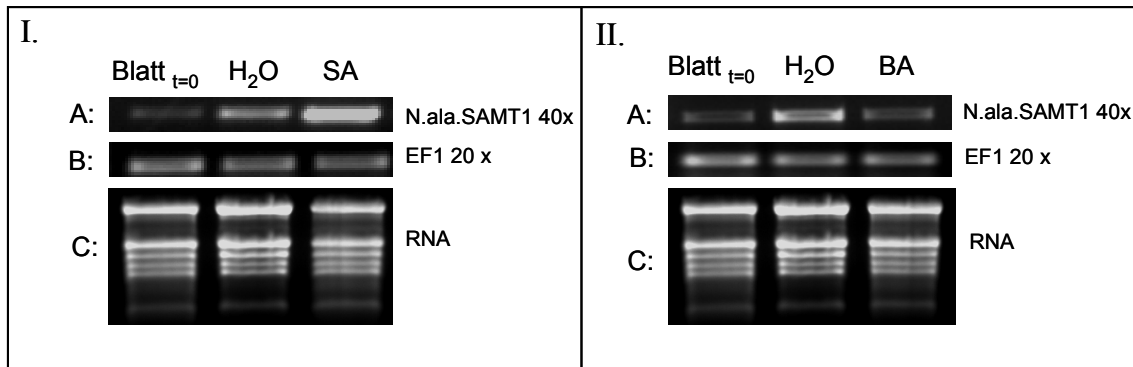


Abbildung 3.29: Untersuchung der Induzierbarkeit der N.ala.SAMT1 durch Salizylsäure bzw. Benzoesäure.

Es wurden jeweils 2 μg Gesamt-RNA für die cDNA Synthesen eingesetzt (I und II, C). Zudem erfolgte eine Standardisierung mittels EF1 α . Die Zyclenzahl der PCR betrug 20 (I und II, B). Nach dieser Zyclenzahl war noch keine Sättigung erreicht. **I:** Untersuchung der Induzierbarkeit der N.ala.SAMT1 mittels 5 mM Salizylsäure (Spur A). **II:** Untersuchung der Induzierbarkeit der N.ala.SAMT1 mit 5 mM Benzoesäure (Spur A).

Die Zyklenzahl der PCR für den Nachweis der N.ala.SAMT1 betrug 40, da nach dieser Zyklenzahl erst deutliche Signale zu erkennen, aber noch keine Sättigung erreicht war. Über Spur A ist jeweils die Behandlung der Proben erkennbar (Blatt $t=0$: zum Zeitpunkt $t=0$ geerntete Blätter; H₂O: in Wasser inkubiert Blattstücke; SA: in 5 mM Salizylsäure inkubierte Blattstücke; BA: in 5 mM Benzoesäure inkubierte Blattstücke).

3.3 *N. sylvestris*

3.3.1 Potentielle BSMT

3.3.1.1 Expressionsüberprüfung

Anhand der RT-PCR konnte die Expression von BSMTs in Blättern von *N. suaveolens* und *N. alata* nachgewiesen werden. Deshalb wurde vermutet, dass entsprechende Sequenzen auch in *N. sylvestris* exprimiert werden. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde eine RT-PCR auf aus Blättern isolierte Gesamt-RNA durchgeführt. Dabei konnte ein ca. 700 bp großes Fragment isoliert werden, das eine hohe Ähnlichkeit zu der N.sua.BSMT2-1 und der N.ala.BSMT2-1 aufwies (Abb. 3.30).

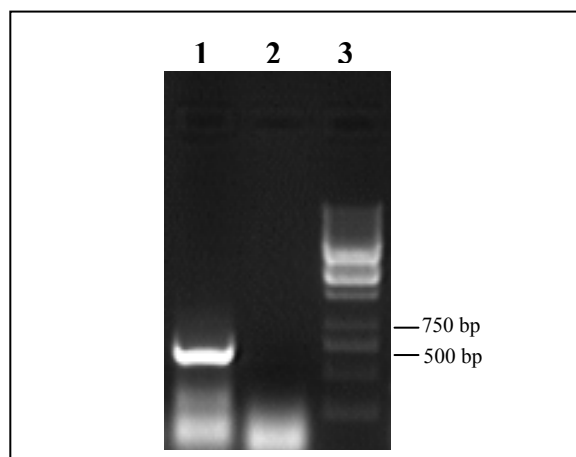


Abbildung 3.30: Expressionsüberprüfung der N.syl.BSMT2-1 aus *N. sylvestris*.

Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination: N.sylv.fw1 + N.sylv.rev1 (Spur 1); 1000 bp Marker (Spur 3); Negativkontrolle (Spur 2). Die Auftrennung erfolgte durch ein 1 %iges Agarosegel. Die Größe des erhaltenen Fragments betrug 737 bp.

3.3.1.2 Komplettierung der 3'- und 5'-Region

Da der codierende Bereich der *N.syl.BSMT2-1* noch nicht vollständig bekannt war, erfolgte dessen Isolierung mittels 5'- und 3'RACE. Die 5'RACE wurde mit den Primerkombinationen oligo dT-R2-Mix + *sylHRO* 5'RACE nested bzw. oligo dT-R2-Mix + *alaHRO* 5'RACE durchgeführt, wobei beide ein ca. 500 bp großes Fragment lieferten (Abb. 3.31 A). Weiterhin wurde mit der erstgenannten Primerkombination eine unspezifische ca. 300 bp Bande amplifiziert. Das ca. 500 bp Fragment aus Spur 2 (Abb. 3.31 A) wurde aus dem Gel eluiert und mit den pBluescript Vektor ligiert. Dieser Ligationsansatz wurde anschließend für eine Chemotransformation von XL1blue Zellen verwendet. Die Sequenzierung dieses Fragments zeigte, dass es mit der gesuchten Sequenz übereinstimmte. Außerdem enthielt es neben dem fehlenden codierenden Bereich noch 53 bp des 5'UTR-Bereichs.

Mithilfe der 3'RACE konnte ein ca. 800 bp großes Fragment isoliert werden. Dieses Fragment stimmte ebenfalls mit der gesuchten Sequenz überein und enthielt den gesamten 3'UTR-Bereich mit einer Länge von 68 bp (Abb. 3.31 B).

Durch die 5'- und die 3'RACE konnte der gesamte codierende Bereich der *N.syl.BSMT2-1* isoliert werden. Inklusive Stoppcodon hat er eine Länge von 1161 bp, welches einer Proteinlänge von 386 Aminosäuren entspricht. Die *N.syl.BSMT2-1* ist somit um eine Aminosäure kürzer als die *N.sua.BSMT2-1* und die *N.ala.BSMT2-1*, zu denen es auf Aminosäureebene eine Identität von jeweils 86 % aufweist. Mit der *N.sua.BSMT1-1* aus *N. suaveolens* ist es zu 75,8 % identisch.

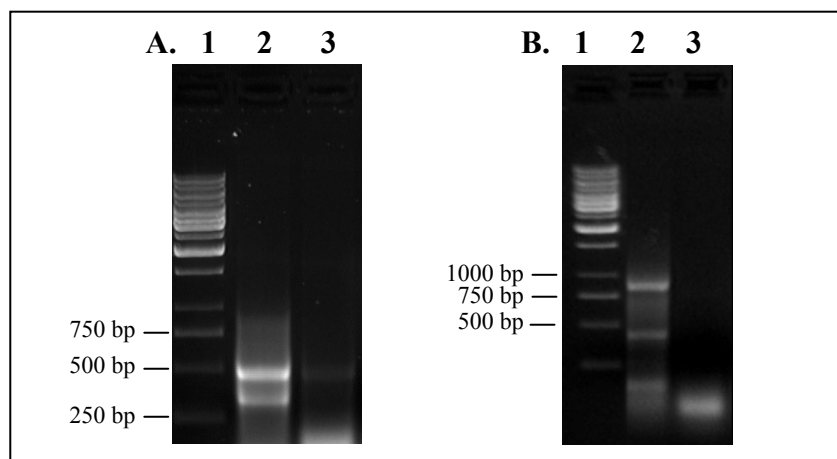


Abbildung 3.31: Suche nach dem 5'- und 3'UTR-Bereich der *N.syl.BSMT2-1* aus *N. sylvestris*.

A: Isolation des 5'UTR-Bereichs durch 5'RACE. Mit der Primerkombination: oligo dT-R2-Mix + *sylHRO* 5'RACE nested (Spur 2) wurde ein ca. 500 bp großes Fragment erhalten, das aus dem Gel eluiert und später sequenziert wurde; Primerkombination oligo dT-R2-Mix + *alaHRO* 5'RACE (Spur 3); 1000 bp-Marker (Spur 1). **B:** Ergebnis der 3'RACE. Mit der Primerkombination: *N.sylRACE1fwFH* und R2 (Spur 2) wurde ein ca. 800 bp Fragment erhalten, welches den gesuchten 3'UTR-Bereich enthielt; 1000 bp Marker (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte jeweils mittels 1 %igem Agarosegel.

3.3.1.3 Heterologe Expression

Um die Substratspezifität der *N.syl.BSMT2-1* untersuchen zu können, wurde die Sequenz zuvor durch RT-PCR amplifiziert (Abb. 3.32) und anschließend in den pET 101/D-TOPO Vektor integriert. Nach der Chemotransformation von TOP10 Zellen mit dem pET 101/D-TOPO Vektor wurde mittels Sequenzierung eine für die Überexpression geeignete Sequenz gesucht. Dies war notwendig, um sicherzustellen, dass es während der cDNA Synthese bzw. der PCR nicht zu Basenaustauschen gekommen ist.

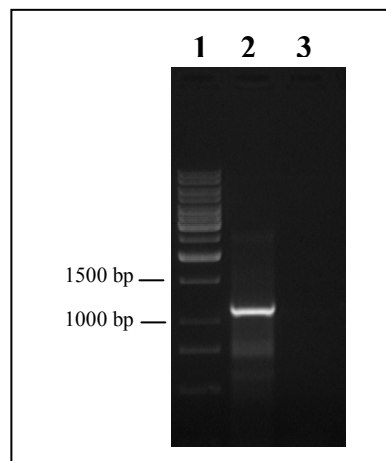


Abbildung 3.32: RT-PCR Fragment des gesamten codierenden Bereichs der *N.syl.BSMT2-1* aus *N. sylvestris*.

Mithilfe der RT-Reaktion und anschließender PCR mit der Primerkombination alaHROüefw und alaHROüerew wurde ein dominantes Fragment einer Größe von 1162 bp synthetisiert (Spur 2) und anschließend durch Gelelektrophorese aus dem 1 %igen Agarosegel isoliert. Negativkontrolle (Spur 3); 1000 bp Marker (Spur 1).

3.3.1.4 Überexpression der *N.syl.BSMT2-1* aus *N. sylvestris*

Die Aufreinigung der *N.syl.BSMT2-1* erfolgte durch IMAC über Ni-NTA-Säulen (Abb. 3.33 A). Das überexprimierte Protein wurde durch Westernblotanalyse mittels Anti-His-AK (Abb. 3.33 B) nachgewiesen. Aufgrund der Voruntersuchungen durch GC-MS Analyse (siehe 6.4) und Aktivitätsbestimmungen der *E. coli*-Rohextrakte konnten geeignete Bedingungen für die Überexpression der *N.syl.BSMT2-1* bestimmt werden. Dabei stellte sich eine 20-stündige Inkubation der mit IPTG induzierten HMS174(DE3) Zellen bei 20 °C als optimal heraus.

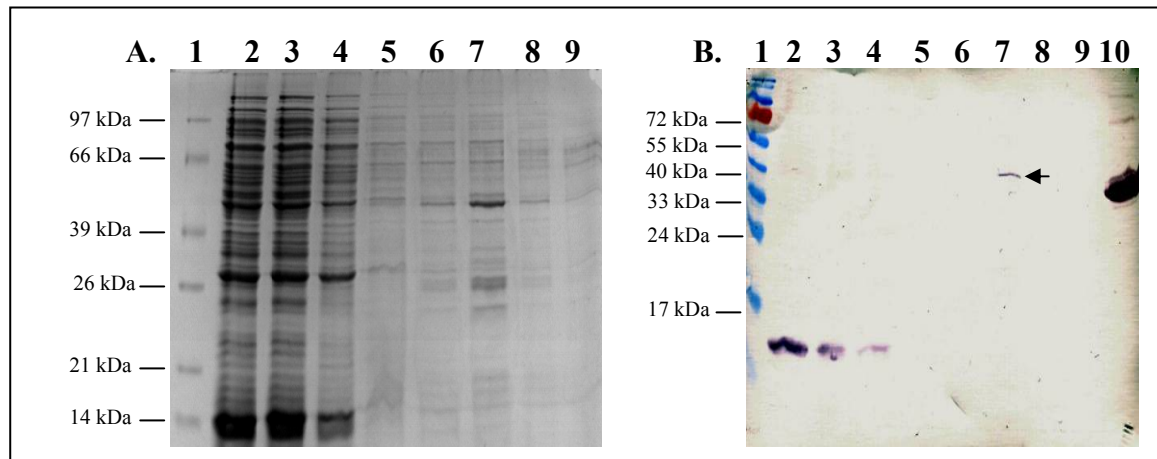


Abbildung 3.33: Aufreinigung und Nachweis der N.syl.BSMT2-1 aus *N. sylvestris*.

A: SDS-Gel der verschiedenen Aufreinigungsschritte der N.syl.BSMT2-1. *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 2); Säulendurchfluß (Spur 3); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 4 und 5); Eluate 1-4 (Spur 6-9); „Low-Range“ (Roche) Proteingrößenstandard (Spur 1) **B:** Westernblot zum Nachweis des überexprimierten Proteins. Proteingrößenstandard (Rothi-Pre-stained), (Spur 1); *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 2); Säulendurchfluß (Spur 3); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 4 und 5); Eluate 1-4 (Spur 6-9); N.sua.BSMT1-1 (Positivkontrolle), (Spur 10). Die N.syl.BSMT2-1 konnte im 2. Eluat (Spur 7, Pfeil) nachgewiesen werden. Vom Standard wurden jeweils 5 µl und von den Proben 20 µl auf die Gele aufgetragen.

3.3.1.5 Bestimmung der Substratspezifität

Nachdem es gelungen war die N.syl.BSMT2-1 zu überexprimieren und aufzureinigen, wurde mittels eines *in vitro* durchgeführten Enzymtest dessen Substratspezifität bestimmt. Die höchste Enzymaktivität von 1,62 pkat/mg Protein konnte mit Benzoesäure als Substrat nachgewiesen werden. Sie wurde 100 % gesetzt und alle anderen Aktivitäten relativ dazu berechnet (Abb. 3.34). Neben Benzoesäure stellte sich die 3-Hydroxybenzoesäure mit 86,51 % (max. 1,28 pkat/mg Protein) als bevorzugtes Substrat heraus. Daneben wurden noch 4-Hydroxybenzoesäure mit 13,66 %, 2,3-Dihydroxybenzoesäure (10,29 %), 3,4- Dihydroxybenzoesäure (26,31 %), 3,5- Dihydroxybenzoesäure (13,17 %) und 2-Methoxybenzoesäure (22,93 %) umgesetzt. Bei allen anderen Substraten wurden nur relative Enzymaktivitäten unter 5 % erreicht. Auch bei der Salizylsäure konnte nur eine relative Enzymaktivität von 3,25 % im Vergleich zu Benzoesäure nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Identität von jeweils 86 % zu der bereits isolierten N.sua.BSMT2-1 und N.ala.BSMT2-1, wird das Enzym im weiteren Verlauf als „N.syl.BSMT2-1“ bezeichnet.

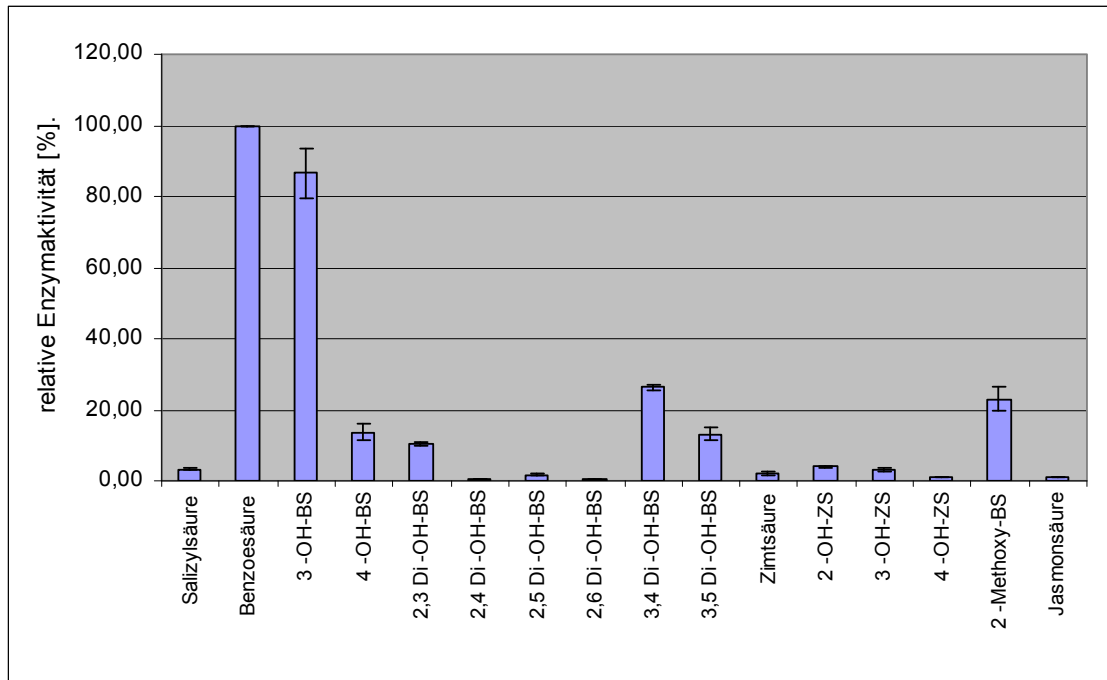


Abbildung 3.34: Substratspezifität der N.syl.BSMT2-1 aus *N. sylvestris*.

Die mit Salizylsäure ermittelte Enzymaktivität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu berechnet. Die Untersuchungen wurden mit Tris/HCl-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Es wurden 2 unabhängige Testreihen mit Doppelansätzen durchgeführt. Die relative Abweichung vom Mittelwert ist angegeben. Die für Benzoessäure maximal erreichte Enzymaktivität betrug 1,62 μ kat/mg Protein. Es wurden etwa 5 μ g Enzym pro Reaktionsansatz eingesetzt.

3.3.1.6 Expressionsuntersuchungen

Die N.syl.BSMT2-1 wurde außer in der Wurzel in allen Geweben und zu allen Erntezeitpunkten nachgewiesen (Abb. 3.35). Allerdings scheint der „steady-state Gehalt“ an N.syl.BSMT2-1 mRNA in Blättern etwas höher zu sein als in Blüten, da dort die PCR-Fragmente erst nach 30 Zyklen nachgewiesen werden konnten, wohingegen dies in Blättern schon nach 25 Zyklen möglich war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die N.syl.BSMT2-1 in Blättern stärker exprimiert wird als in Blüten. Da die entsprechenden Untersuchungen allerdings nur einmal durchgeführt wurden, ist es wichtig sie durch eine weitere unabhängige Testreihe zu verifizieren.

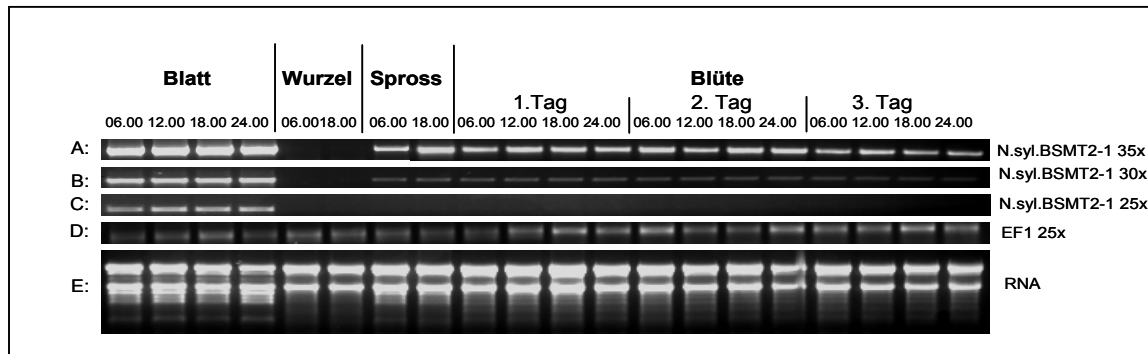


Abbildung 3.35: Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der *N.syl.BSMT2-1* aus *N. sylvestris* mittels RT-PCR

Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA Synthesen eingesetzt (Spur E). Zudem erfolgte eine Standardisierung mittels EF1 α . Die Zyklenzahl der PCR betrug 25 (Spur D). Nach dieser Zyklenzahl war noch keine Sättigung erreicht. Die Expression der *N.syl.BSMT2-1* konnte außer in Wurzeln in allen Organen und zu allen Erntezeitpunkten nachgewiesen werden (Spur A und B). Es wurden unabhängige PCRs mit 25 Zyklen (Spur C), 30 Zyklen (Spur B) und mit 35 Zyklen (Spur A) durchgeführt, um zu zeigen, dass noch keine Sättigung erreicht war. Über der Spur A sind die jeweiligen Erntezeitpunkte und die entsprechenden Organe aufgetragen. Bei den Blüten wurde zusätzlich das Blütenalter genannt.

3.3.1.7 Regulation der *N.syl.BSMT2-1* Expression

Ob und in welchem Maße sich der „steady-state Gehalt“ der *N.syl.BSMT2-1* mRNA durch Zugabe von Salizylsäure bzw. Benzoessäure verändert, wurde ebenfalls durch RT-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass es durch Zugabe von Benzoessäure zu einer geringen Abnahme des „steady-state Gehalts“ von *N.syl.BSMT2-1* mRNA im Blattgewebe kommt, was auf eine verringerte Expression oder einen erhöhten Abbau der RNA schließen lässt (Abb. 3.36 II). Bei der Zugabe von Salizylsäure ist das Ergebnis nicht so offensichtlich. Es scheint aber auch hier zu einer Abnahme der vorhandenen *N.syl.BSMT2-1* mRNA im Gewebe zu kommen (Abb. 3.36, I).

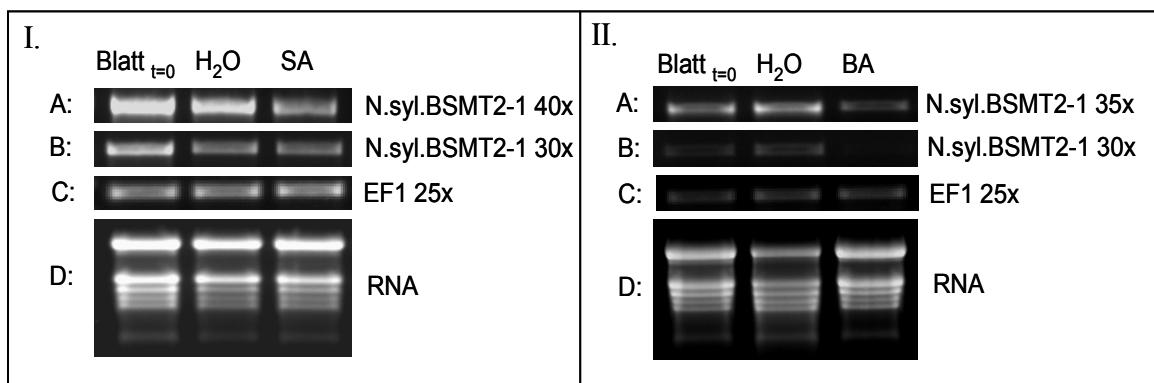


Abbildung 3.36: Untersuchung der Regulation der *N.syl.BSMT2-1* durch Salizylsäure bzw. Benzoessäure.

Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA Synthesen eingesetzt (I und II, D). Zudem erfolgte eine Standardisierung durch EF1 α . Die Zyklenzahl der PCR betrug 25 (I und II, C). **I:** Untersuchung der Induzierbarkeit der *N.syl.BSMT2-1* mittels 5 mM Salizylsäure (Spur A und B). **II:** Untersuchung der Induzierbarkeit der *N.syl.BSMT2-1* durch 5 mM Benzoessäure (Spur A und B). Die Zyklenzahl der PCR betrug 30 und 40 (I; Spur A und B) bzw. 30 und 35 (II; Spur A und B).

Über Spur A ist jeweils die Behandlung der Proben erkennbar (Blatt $t=0$: zum Zeitpunkt $t=0$ geerntete Blätter; H₂O: in Wasser inkubiert Blattstücke; SA: in 5 mM Salizylsäure inkubierte Blattstücke; BA: in 5 mM Benzoessäure inkubierte Blattstücke).

3.3.2 Potentielle N.syl.SAMT

3.3.2.1 Expressionsnachweis

Von Todd Barkman (Western Michigan University) wurde die Teilsequenz einer potentiellen SAMT aus *N. sylvestris* (N.syl.SAMT1) zur Verfügung gestellt. Zu Beginn der Untersuchungen wurde überprüft, ob die Expression der N.syl.SAMT1 nachgewiesen werden kann. Es stellte sich heraus, dass unter Normalbedingungen in Blättern keine Expression nachweisbar war, deshalb wurde die Expression mit 5 mM Salizylsäure induziert. Daraufhin konnte durch RT-PCR ein ca. 1000 bp großes Fragment amplifiziert werden, das mit der gesuchten Sequenz übereinstimmte (Abb. 3.37).

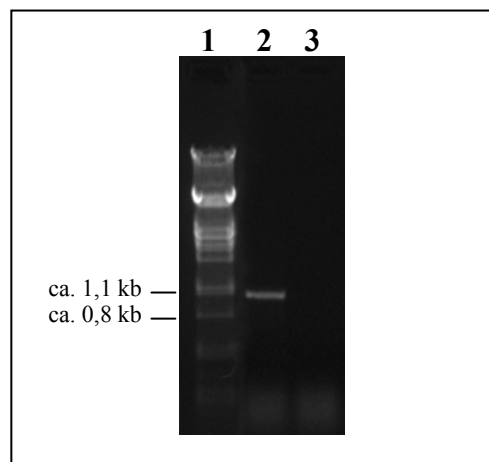


Abbildung 3.37: Expressionsüberprüfung der N.syl.SAMT1 aus *N. sylvestris*.

Ergebnis der RT-PCR mit der Primerkombination: Nala fw1 + Nala rew1 (Spur 2); Längenstandard, λ DNA *Pst* I verdaut (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte mittels 1 %igem Agarosegel. Die Größe des erhaltenen Fragments betrug 1028 bp.

3.3.2.2 Komplettierung der 3'- und 5'-Region

Für die Überexpressionsuntersuchungen war es notwendig, den gesamten codierenden Bereich der N.syl.SAMT1 zu kennen. Die Isolation der 5'UTR-Region mithilfe der 5'RACE blieb anfänglich erfolglos (nicht gezeigt). Deshalb wurde versucht, die 5'UTR-Region mittels RT-PCR, mit aus dem 5'UTR-Bereich der N.tab.SAMT1 von *N. tabacum* abgeleiteten Primern, zu isolieren. Dadurch konnte ein Fragment mit einer Länge von ca. 700 bp erhalten werden, das abzüglich der Primersequenz 36 bp des 5'UTR-Bereichs enthielt (Abb. 3.38 A). Im Rahmen der 5'RACE der N.syl.BSMT2-1 konnte zusätzlich zu dieser Sequenz auch der 5'UTR-Bereich der N.syl.SAMT1 isoliert werden. Er stimmte mit der durch RT-PCR bereits isolierten Sequenz überein, war allerdings noch um 39 bp länger. Somit beträgt die Gesamtlänge der bekannten 5'UTR-Region der N.syl.SAMT1 75 bp.

Die Isolation des 3'UTR-Bereichs der *N.syl.SAMT1* erfolgte ebenfalls durch RT-PCR mit aus der 3'UTR-Region der *N.tab.SAMT1* von *N. tabacum* abgeleiteten Primern. Dabei konnte ein ca. 500 bp langes Fragment isoliert werden, das der gesuchten Sequenz entsprach und abzüglich der Primersequenz 51 bp der 3'UTR-Region enthielt (Abb. 3.38 B).

Die Länge des gesamten codierenden Bereichs der *N.syl.SAMT1* umfasst somit 1077 bp, was einem Protein von 358 Aminosäuren entspricht.

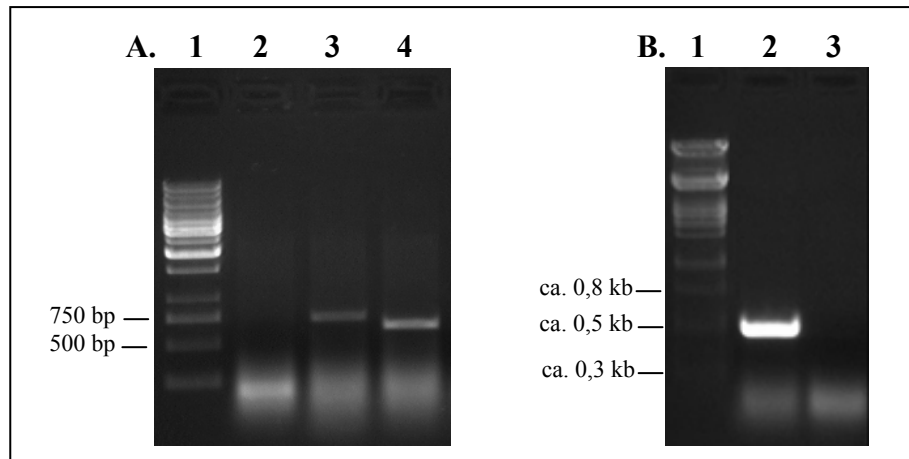


Abbildung 3.38: Suche nach dem 5'- und 3'UTR-Bereich der *N.syl.SAMT1* aus *N. sylvestris*.

A: Isolation des 5'UTR-Bereichs durch RT-PCR; Mit der Primerkombination: *N.tab* 5'UTR2 und *N.syl* 5'RACE nested (Spur 2) wurde ein ca. 700 bp großes Fragment erhalten, das aus dem Gel eluiert und später sequenziert wurde; Positivkontrolle, Primerkombination *Nala fw1* und *N.syl* 5'RACE nested (Spur 3); 1000 bp-Marker (Spur 1). **B:** Identifizierung der 3'UTR-Region mittels RT-PCR. Mit der Primerkombination: *N.ala* 3'RACE und *N.tab* 3'UTR (Spur 2) wurde ein ca. 500 bp Fragment erhalten, welches den gesuchten 3'UTR-Bereich enthielt; Längenstandard, λ DNA *Pst* I verdaut (Spur 1); Negativkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung erfolgte jeweils durch ein 1 %iges Agarosegel.

3.3.2.3 Heterologe Expression

Für die Überexpression der *N.syl.SAMT1* aus *N. sylvestris* musste diese zuvor in einen geeigneten Überexpressionsvektor integriert werden. Da die Überexpression im pET 101/D-TOPO Vektor nicht zum Erfolg führte (nicht gezeigt), wurde als weiterer Überexpressionsvektor der pET SUMO Vektor verwendet. Zu diesem Zweck wurde die *N.syl.SAMT1* mit der Primerkombination *sylSAMTexpfw* und *sylSAMTexprev* durch RT-PCR amplifiziert. Dabei konnte ein ca. 1100 bp großes Fragment erhalten werden (Abb. 3.39). Durch Sequenzierung, von in verschiedene Klone integrierte Vektoren, erfolgte anschließend die Isolation einer für die Überexpression geeigneten Sequenz.

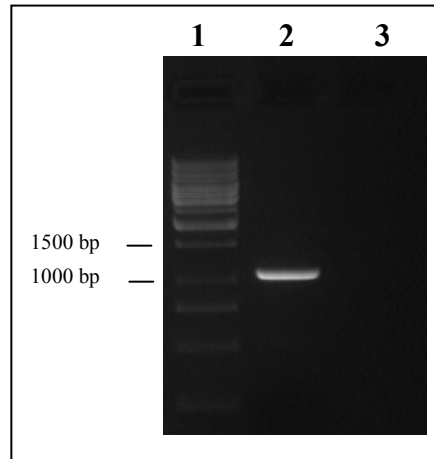


Abbildung 3.39: RT-PCR Fragment des gesamten codierenden Bereichs der N.syl.SAMT1 aus *N. sylvestris*.

Durch RT-Reaktion und anschließender PCR mit der Primerkombination sylSAMTexpfw und sylSAMTexprev wurde ein Fragment einer Größe von 1077 bp synthetisiert (Spur 2) und anschließend mittels Gelelektion aus dem 1 %igen Agarosegel isoliert. Negativkontrolle (Spur 3); 1000 bp Marker (Spur 1).

3.3.2.4 Überexpression der N.syl.SAMT1 aus *N. sylvestris*

Für die Überexpression der N.syl.SAMT1 wurden HMS174(DE3) Zellen verwendet. Sie erfolgte mit einer Inkubationszeit von 20 h bei 20 °C, da sich diese Bedingungen in den Voruntersuchungen als besonders günstig herausgestellt hatten. Die Aufreinigung wurde durch IMAC über Ni-NTA Säulen durchgeführt. Dabei ist es gelungen, die ca. 55 kDa große N.syl.SAMT1 (inklusive SUMO-Protein) anzureichern. Das Ergebnis der einzelnen Aufreinigungsschritte der N.syl.SAMT1 ist in Abb. 3.40 A dargestellt. In Abb. 3.40 B erfolgte der Nachweis des überexprimierten Enzyms mithilfe der Westernblotanalyse.

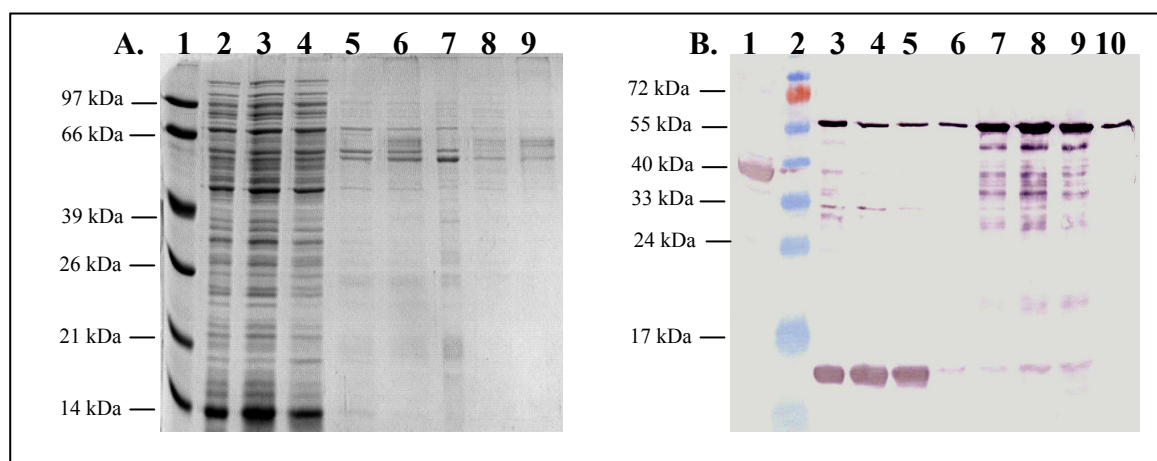


Abbildung 3.40: Aufreinigung und Nachweis der N.syl.SAMT1 aus *N. sylvestris*.

A: SDS-Gel der verschiedenen Aufreinigungsschritte der N.syl.SAMT1. *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 2); Säulendurchfluß (Spur 3); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 4 und 5); Eluate 1-4 (Spur 6-9); „Low-Range“ (Roche) Proteingrößenstandard (Spur 1). **B:** Westernblot zum Nachweis des überexprimierten Proteins. N.sua.BSMT1-1 (Positivkontrolle), (Spur 1); Proteingrößenstandard (Rothi-Prestained), (Spur 2); *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 3); Säulendurchfluß (Spur 4); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 5 und 6); Eluate 1-4 (Spur 7-10). Vom Standard wurden jeweils 5 µl und von den Proben 20 µl auf die Gele aufgetragen.

3.3.2.5 Bestimmung der Substratspezifität

Die Substratspezifität wurde durch einen radioaktiven Enzymtest bestimmt. Die höchste Enzymaktivität von 19,71 pkat/mg Enzym wurde mit Salizylsäure als Substrat erreicht. Diese Aktivität wurde 100 % gesetzt und alle anderen relativ dazu berechnet (Abb. 3.41). Neben der Salizylsäure wurden nur noch 2,3-Dihydroxybenzoesäure mit 14,4 % (max. 3,14 pkat/mg Enzym) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure mit 9,38 % (max. 2,39 pkat/mg Enzym) mit einer relativen Enzymaktivität über 5 % umgesetzt. Mit Benzoesäure konnte nur eine relative Enzymaktivität von 3,78 % (max. 0,78 pkat/mg Enzym) erreicht werden. Aufgrund der hohen Enzymaktivität mit Salizylsäure im Vergleich zu Benzoesäure und den restlichen getesteten Substraten, sowie der großen Identität der Sequenz zu den bereits isolierten SAMTs, wird dieses Enzym auch im weiteren Verlauf als „*N.syl.SAMT1*“ bezeichnet.

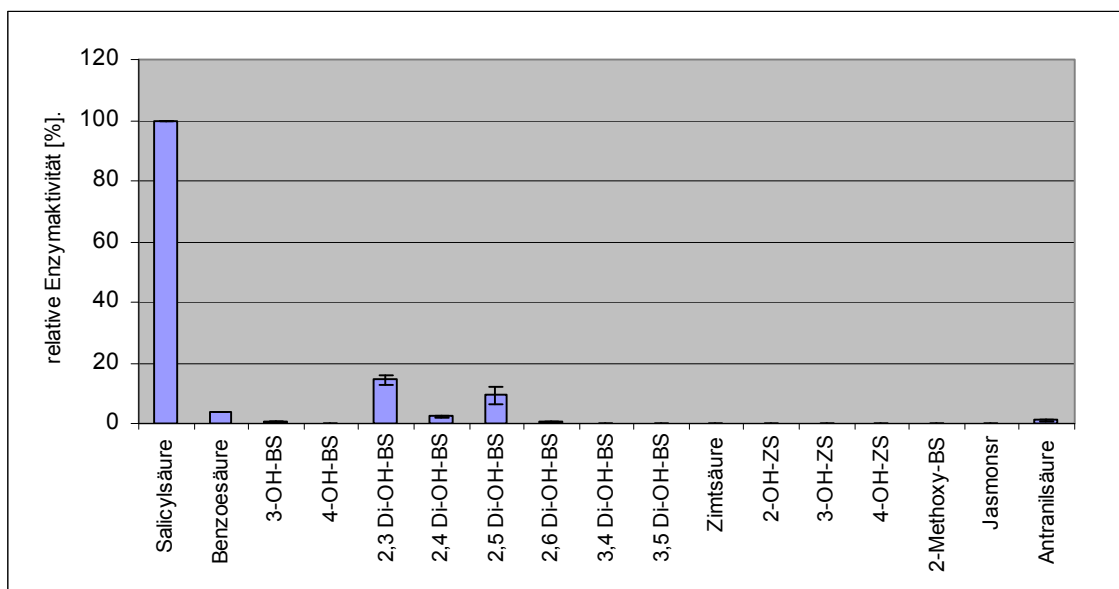


Abbildung 3.41: Substratspezifität der *N.syl.SAMT1* aus *N. sylvestris*.

Die mit Salizylsäure ermittelte Enzymaktivität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu berechnet. Die Untersuchungen wurden mit Tris/HCl-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Es wurden 2 unabhängige Testreihen mit Doppelansätzen durchgeführt. Die relative Abweichung vom Mittelwert ist angegeben. Die für Salizylsäure maximal erreichte Enzymaktivität betrug 19,71 pkat/mg Protein. Es wurden etwa 2,3 µg Enzym pro Reaktionsansatz eingesetzt.

3.3.2.6 Expressionsuntersuchungen

Der „steady-state Gehalt“ an *N.syl.SAMT1* mRNA wurde durch RT-PCR in unterschiedlichen und zu verschiedenen Zeitpunkten geernteten Organen untersucht. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zudem wurde jeweils eine unabhängige RT-PCR mit dem Transkriptions-Elongationsfaktor 1 α , der als externer Standard Verwendung fand, durchgeführt. Von jedem

cDNA Ansatz wurden immer mehrere unabhängige PCRs mit unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt. Damit sollte gezeigt werden, dass sich die PCR noch in der exponentiellen Phase befand. Mithilfe der RT-PCR ließ sich die *N.syl.SAMT1* mRNA nur in den Wurzeln nachweisen.

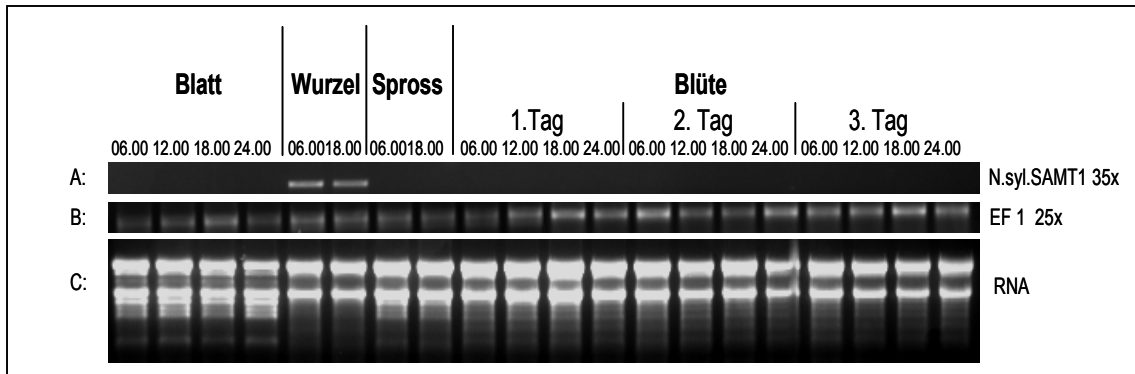


Abbildung 3.42: Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der *N.syl.SAMT1* aus *N. sylvestris* mittels RT-PCR.

Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA Synthesen eingesetzt (Spur C). Zudem erfolgte eine Standardisierung durch EF1 α . Die Zyklenzahl der PCR betrug 25 (Spur B). Nach dieser Zyklenzahl war noch keine Sättigung erreicht. Die Expression der *N.syl.SAMT1* konnte ausschließlich in Wurzeln nachgewiesen werden (Spur A).

Über der Spur A sind die jeweiligen Erntezeitpunkte und die entsprechenden Organe aufgetragen. Bei den Blüten wurde zusätzlich das Blütenalter erwähnt.

3.3.2.7 Induzierbarkeit der *N.syl.SAMT1* Expression

Durch die Inkubation von Blattstücken in 5 mM Salizylsäure bzw. Benzoesäure sollte untersucht werden, ob durch diese Verbindungen eine Veränderung des „steady-state Gehalts“ an *N.syl.SAMT1* mRNA hervorgerufen wird. In Abb. 3.43 I; Spur A ist ersichtlich, dass die Expression der *N.syl.SAMT1* durch Salizylsäure induziert werden konnte. Auch durch Benzoesäure erfolgte eine Induktion der *N.syl.SAMT1* (Abb. 3.43 II; Spur A; Pfeil), allerdings fiel sie deutlich geringer aus als die durch Salizylsäure induzierte Expression.

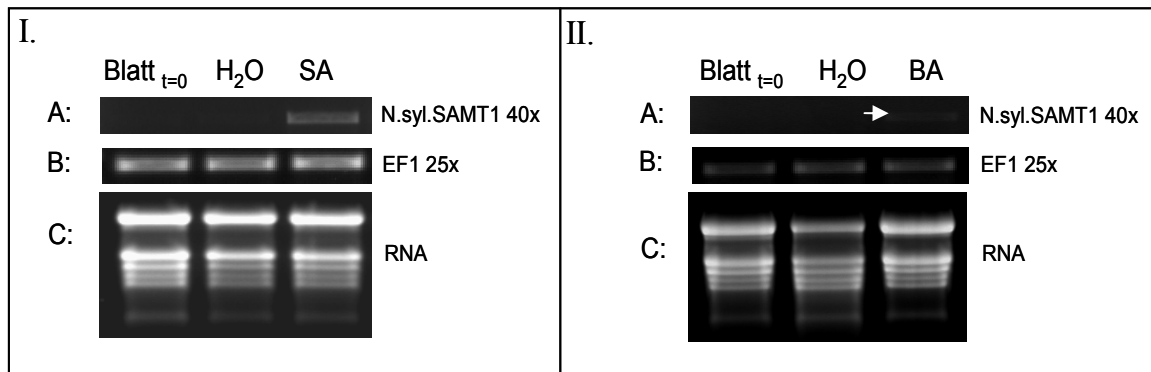


Abbildung 3.43: Untersuchung der Induzierbarkeit der N.syl.SAMT1 durch Salizylsäure bzw. Benzoessäure.

Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA Synthesen eingesetzt (I und II, C). Zudem erfolgte eine Standardisierung mittels EF1 α . Die Zyclenzahl der PCR betrug 25 (I und II, B). Nach dieser Zyclenzahl war noch keine Sättigung erreicht. **I:** Untersuchung der Induzierbarkeit der N.syl.SAMT1 durch 5 mM Salizylsäure (Spur A). **II:** Untersuchung der Induzierbarkeit der N.syl.SAMT1 durch 5 mM Benzoessäure (Spur A). Die Zyclenzahl der PCR betrug 40 (I und II; Spur A).

Über Spur A ist jeweils die Behandlung der Proben erkennbar (Blatt $t=0$: zum Zeitpunkt $t=0$ geerntete Blätter; H₂O: in Wasser inkubiert Blattstücke; SA: in 5 mM Salizylsäure inkubierte Blattstücke; BA: in 5 mM Benzoessäure inkubierte Blattstücke).

3.4 *N. gossei*

3.4.1 Potentielle BSMT

3.4.1.1 Amplifizierung und Überexpression der potentiellen BSMT aus *N. gossei*

N. gossei stellt eine nahe Verwandte zu *N. suaveolens* dar (Chase et al., 2003). Allerdings wurde im Blütenduft anstelle des Methylbenzoats, Methylnikotinat nachgewiesen. In der Arbeitsgruppe von Todd Barkman (Western Michigan University) konnte aus Blüten von *N. gossei* eine 1068 bp lange Sequenz isoliert werden, die eine hohe Ähnlichkeit zur blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* aufwies. Auf Proteinebene unterscheiden sich die Sequenzen lediglich durch 13 Aminosäure-Austausche. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Enzym überexprimiert und dessen Substratspezifität bestimmt. Die von Todd Barkman zur Verfügung gestellte Sequenz wurde durch PCR vervielfältigt und anschließend in den pET SUMO Vektor integriert. Daraufhin erfolgte die Überexpression in HMS174(DE3) Zellen bei 13 °C für 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und das rekombinante Protein über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Das Ergebnis der Aufreinigung wird in Abb. 3.44 dargestellt.

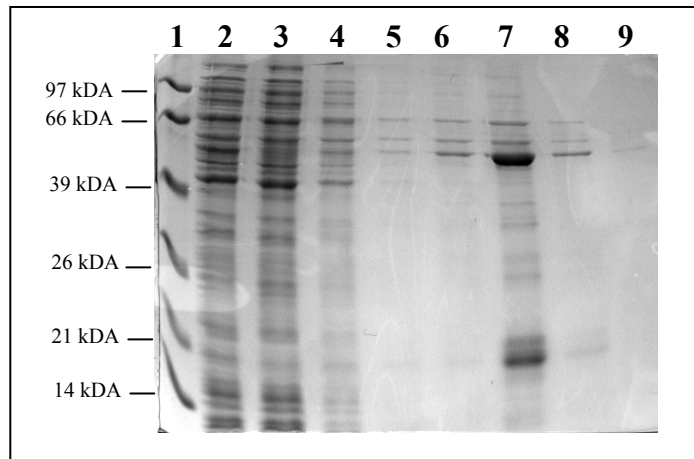


Abbildung 3.44: Aufreinigung der potentiellen BSMT aus *N. gossei* (N.gos.NAMT1-1).

SDS-Gel der verschiedenen Aufreinigungsschritte der potentiellen BSMT. *E. coli*-Rohextrakt vor der Säule (Spur 2); Säulendurchfluß (Spur 3); 1. und 2. Waschen mit je 50 mM Imidazol (Spur 4 und 5); Eluate 1-4 (Spur 6-9); „Low-Range“ (Roche) Proteingrößenstandard (Spur 1). Vom Standard wurden jeweils 5 µl und von den Proben 20 µl auf die Gele aufgetragen.

3.4.1.2 Bestimmung der Substratspezifität

Die Bestimmung der Substratspezifität erfolgte durch einen radioaktiven Enzymtest. Dabei konnten lediglich bei Nikotinsäure und Salizylsäure relative Enzymaktivitäten über 2 % ermittelt werden (Abb. 3.45). Die am effizientesten umgesetzte Verbindung war Nikotinsäure mit einer maximal erreichten Enzymaktivität von 0,54 pkat/mg Protein. Salizylsäure wurde mit einer relativen Enzymaktivität von 20,7 % (0,1 pkat/mg Protein) genutzt. Benzoesäure wurde nur mit einer relativen Enzymaktivität von 0,9 % (0,005 pkat/mg Protein) im Vergleich zur Nikotinsäure umgesetzt.

Durch die Aufreinigung verlor das Protein massiv an Aktivität, so dass bei dem isolierten Enzym keine höheren Enzymaktivitäten erreicht werden konnten als die bereits im *E. coli*-Rohextrakt nachgewiesenen. Alle Versuche, das Enzym bei der Aufreinigung zu stabilisieren, brachten wenig Erfolg. Allerdings konnte eine deutliche Aktivitätssteigerung durch die Erhöhung der eingesetzten SAM-Konzentration im radioaktiven Enzymtest von einem- auf zwei Mikroliter erreicht werden.

Obwohl die potentielle BSMT aus *N. gossei* eine hohe Ähnlichkeit zu den bereits isolierten Enzymen aufweist, ist es aufgrund der ermittelten Substratspezifität nicht möglich, von einer BSMT zu sprechen. Deshalb wird das Enzym im weiteren Verlauf als „N.gos.NAMT1-1“ (nicotinic acid carboxyl methyltransferase) bezeichnet.

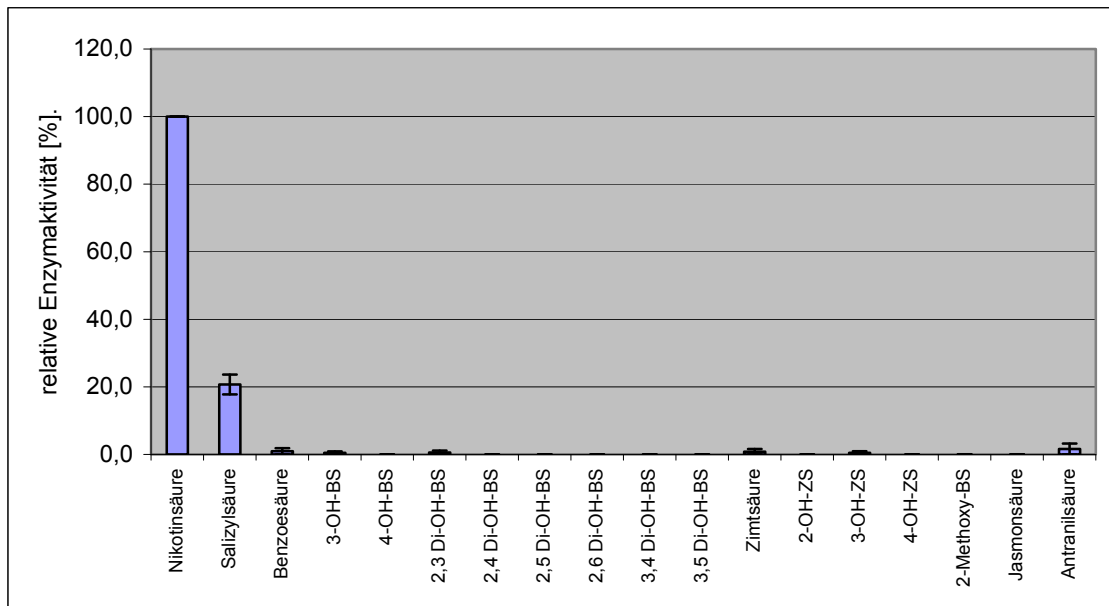


Abbildung 3.45: Substratspezifität der N.gos.NAMT1-1 aus *N. gossei*.

Die mit Nikotinsäure ermittelte Enzymaktivität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu berechnet. Die Untersuchungen wurden mit Tris/HCl-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Es wurden 2 unabhängige Testreihen mit Doppelansätzen durchgeführt. Die relative Abweichung vom Mittelwert ist angegeben. Die für Nikotinsäure maximal erreichte Enzymaktivität betrug 0,54 pkat/mg Protein. Es wurden etwa 7 µg Enzym pro Reaktionsansatz eingesetzt.

3.5 Suche nach potentiellen BSMTs in *N. sylvestris*, *N. alata* und *N. tomentosiformis* mittels RT-PCR

Aufgrund jüngster Ergebnisse, nach denen in *N. tabacum* zwei unterschiedliche BSMT-Typen exprimiert werden (Park et al., 2007; Barkman, unveröffentlicht), sollte der evolutionäre Ursprung dieser Sequenzen untersucht werden. Die Suche nach entsprechenden Sequenzen erfolgte mithilfe der RT-PCR. Dabei konnte in *N. tomentosiformis* mit der Primerkombination BSMT2-F + BSMT2-R eine Sequenz (N.tom.BSMT2-1) von ca. 800 bp mit hoher Identität zu den im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT2-Sequenzen isoliert werden (siehe 6.3.1.4). Durch Direktsequenzierung wurde eine Sequenz mit einer Länge von 579 bp eindeutig bestimmt. In *N. alata* wurde mit der Primerkombination FIL + NEW BSMT-R ein ca 500 bp großes Fragment erhalten (N.ala.BSMT3-1), für welches 421 bp durch Direktsequenzierung bestimmt werden konnten. Die erhaltene Sequenz wies die höchste Ähnlichkeit mit dem aus *N. suaveolens* isolierten Fragment 12 (N.sua.BSMT3-1) auf. Weiterhin wurden aus *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* Fragmente isoliert, die Ähnlichkeit zu der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* aufwiesen. Beide Sequenzen waren zueinander und zu der von Daniel F. Klessig (Cornell University) zur Verfügung gestellten N.t.SAMT1 Sequenz aus *N. tabacum* fast vollständig identisch (Park et al., 2007). Das legt

den Schluß nahe, dass diese Sequenz entweder sehr konserviert ist, oder dass es sich bei einer dieser Sequenzen um eine Kontaminationen handeln könnte.

3.6 Blütenduft von *N. suaveolens*, *N. alata* und *N. sylvestris*

Die Blütenduftzusammensetzung bei unterschiedlichen *Nicotiana*-Arten wurde neben Loughrin et al. in jüngerer Zeit vor allem durch Robert Raguso (University of South Carolina) untersucht und dokumentiert (Loughrin et al., 1990a; Loughrin et al., 1990b; Loughrin et al., 1991; Loughrin et al., 1992; Loughrin et al., 1993; Raguso et al., 2003a; Raguso et al., 2006). Mittels GC-MS Messung erfolgte die Überprüfung, welche Verbindungen sich unter den verwendeten Anbau- und Wachstumsbedingungen im Blütenduft von *N. suaveolens*, *N. alata* und *N. sylvestris* nachweisen ließen. Bei den durchgeführten Messungen konnte lediglich im Blütenduft von *N. suaveolens* Methylbenzoat und Methylsalizylat nachgewiesen werden.

Da es sich bei *N. sylvestris* um eine nur sehr schwach duftende *Nicotiana*-Art handelt, wurden die von vier Blüten emittierten Verbindungen zusammen über 3 Tage gesammelt. Trotzdem konnten weder Methylbenzoat noch Methylsalizylat im Blütenduft von *N. sylvestris* nachgewiesen werden. Die Messungen des Blütenduftes bei *N. alata* erfolgte an ein- und zwei Tage alten Blüten im Zweistundentakt. Dabei ist es ebenfalls nicht gelungen, Methylbenzoat bzw. Methylsalizylat im Blütenduft von *N. alata* nachzuweisen (siehe 6.4.2).

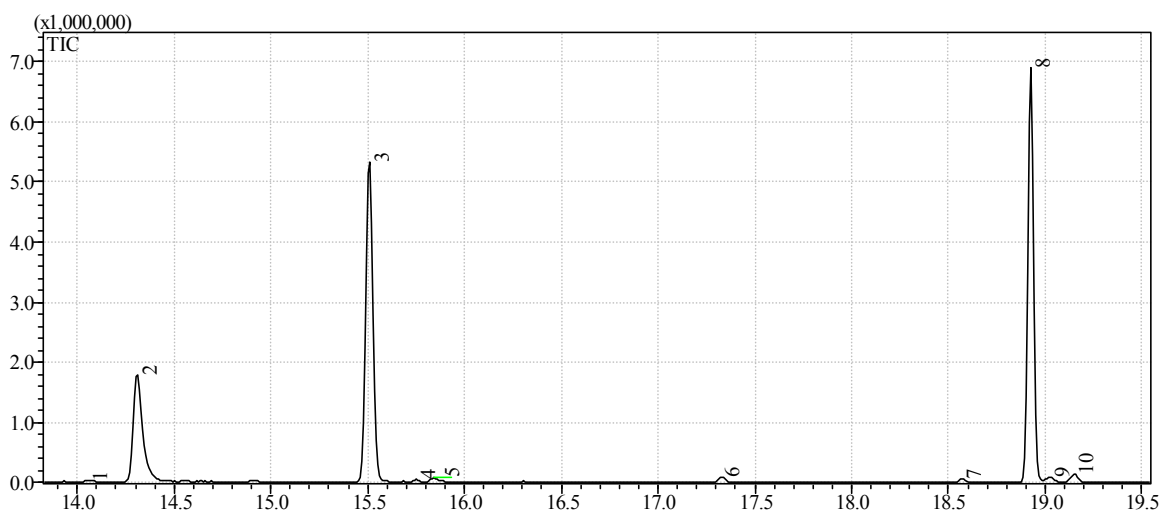


Abbildung 3.46: Blütenduft aus *N. suaveolens*.

Der Duft von 2, zwei Tage alten Blüten wurde zwischen 18.00 Uhr und 24.00 Uhr aufgefangen und anschließend durch GC-MS Analyse untersucht. Die nachgewiesenen Verbindungen sind in Tab. 3.1 beschrieben. Es konnte Methylbenzoat (peak 3) und Methylsalizylat (peak 6) nachgewiesen werden.

Tabelle 3.1: Übersicht der im Blütenduft von *N. suaveolens* nachgewiesenen Verbindungen.

Es wurden 2 zwei Tage alte Blüten von 18.00 Uhr – 24.00 Uhr vermessen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der es sich um die angegebene Verbindung handelt, ist angegeben.

peak	Retentionszeit	Substanz / Sicherheit in %
1	14,04	Methyl-Isobutyl-Keton / 82 %
2	14,24	Benzylalkohol / 94 %
3	15,46	Methylbenzoat / 96 %
4	15,73	unbekannt
5	15,80	Phenylethylalkohol / 95 %
6	17,30	Methylsalizylat / mittels MSA-Standard nachgewiesen
7	18,55	Tetramethylsilan / 82 %
8	18,87	n-Nonylacetat (Standard) / 90 %
9	18,99	1H-Indole / 85 %
10	19,11	Cinnamylalkohol / 90 %

3.7 Übergreifende und zusammenfassende Betrachtungen der identifizierten Enzyme

Die Suche BSMT-ähnlicher Sequenzen in *N. suaveolens* lieferte 12 unterschiedliche Fragmente. Dabei bestand bei den Fragmenten 1-4 eine hohe Ähnlichkeit zu der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1. Die Fragmente 5; 10 und 11 ließen sich der neu isolierten N.sua.BSMT2-1 zuordnen, während die Fragmente 6-8 mit der N.sua.BSMT1-2 übereinstimmten, die jedoch im Enzymtest keine Aktivität mit Benzoesäure und Salizylsäure zeigte, und bei der es sich vermutlich um ein Pseudogen handelt. Das Fragment 12 wurde der neuen N.sua.BSMT3-1 zugeordnet, dessen Sequenz im Rahmen dieser Arbeit allerdings noch nicht komplettiert werden konnte. Das verbleibende Fragment 9, bei dem es sich vermutlich auch um ein Pseudogen handelt, stellte eine verkürzte BSMT-Version dar, die sich keinen der oben genannten *N. suaveolens*-BSMTs eindeutig zuordnen ließ. In *N. alata* konnte auf genomischer Ebene ebenfalls eine BSMT-ähnliche Sequenz isoliert werden, die sich der N.ala.BSMT2-1 zuordnen ließ. Weiterhin wurde durch RT-PCR ein Fragment mit hoher Ähnlichkeit zu der N.sua.BSMT3-1 isoliert, das als N.ala.BSMT3-1 bezeichnet wurde. Auch in *N. sylvestris* konnte auf genomischer Ebene eine BSMT-ähnliche Sequenz identifiziert werden (6.3.2.3). Diese ließ sich der durch RT-PCR isolierten N.syl.BSMT2-1 zuordnen.

Aufgrund ihrer Sequenzen lassen sich die im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMTs in 3 Typen (BSMT-Typ-1; BSMT-Typ-2; BSMT-Typ-3) einteilen. Zu dem ersten Typ (BSMT-Typ-1), für den beispielhaft die blütenspezifische N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* steht, können die *N. suaveolens*-Fragmente 1–4 und 6-9 gezählt werden. Die Enzyme des BSMT-Typ-2 enthalten nahe dem C-Terminus eine 31-32 Aminosäuren lange Insertion, durch die sie sich vom BSMT-Typ-1 unterscheiden lassen. Die Insertion liegt in einer Region des Proteins, in der auch aus anderen Arten isolierte SAMTs und BSMTs zueinander in ihrer Länge und Sequenz sehr variabel sind (Pott et al., 2004; Effmert et al., 2005). Es kann vermutet werden,

dass es sich bei dieser variablen Region um einen Bereich handelt, der für die Enzymaktivität der Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen von untergeordneter Bedeutung ist und somit weniger konserviert ist als das restliche Protein. Die N.ala.BSMT2-1 aus *N. alata* und die N.syl.BSMT2-1 aus *N. sylvestris* enthalten ebenso wie die N.sua.BSMT2-1 die C-terminale Insertion, weshalb sie dem BSMT-Typ-2 zugerechnet werden. Neben den Enzymen, die sich in den BSMT-Typ-1 und dem BSMT-Typ-2 einordnen lassen, konnten aus *N. suaveolens* und *N. alata* BSMT-ähnliche Sequenzen isoliert werden (N.sua.BSMT3-1 und N.ala.BSMT3-1), die sich durch vereinzelte Insertionen und Deletionen von den dortigen Enzymen unterscheiden. Da die für die Enzyme codierenden Regionen noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, lassen sich die Enzyme noch keinem der oben genannten Enzymtypen eindeutig zuordnen. Aufgrund ihrer Abweichungen von den Enzymen der ersten beiden Typen, wird für sie vorerst der neue BSMT-Typ-3 definiert. Die vollständige Aufklärung der codierenden Regionen der bereits isolierten N.sua.BSMT3-1 und der N.ala.BSMT3-1 werden zeigen, ob es sich bei diesen Enzymen tatsächlich um einen weiteren BSMT-Typ handelt oder ob sie einem der ersten beiden Typen zugeordnet werden können. Die ermittelten Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Enzyme im Vergleich zu bereits beschriebenen SAMTs und BSMTs sind zusammenfassend in Tab. 3.2 und Tab. 3.3 dargestellt.

Neben den BSMTs konnten in allen drei untersuchten *Nicotiana*-Arten auch jeweils die Expression einer SAMT-Sequenz nachgewiesen werden. Die SAMTs lassen sich aufgrund ihrer Sequenz eindeutig von den BSMT-Sequenzen unterscheiden. Sie sind alle gleich lang und zeigen zueinander sehr hohe Identitäten, weshalb hier keine unterschiedlichen Enzymtypen definiert wurden. Die SAMTs und BSMTs lassen sich neben ihrer Gesamtsequenz auch durch die Aminosäuren des aktiven Zentrums unterscheiden. Während die aktiven Zentren der isolierten *Nicotiana*-SAMTs hoch konserviert sind, weisen die der isolierten *Nicotiana*-BSMTs eine bedeutend höhere Variabilität auf (Tab. 3.4).

Tab. 3.2: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT- und SAMT-Sequenzen.

Enzym-Name	Pflanzen-Art	Nukleotide [bp]	Aminosäuren	Proteingröße [kDa]	Bevorzugte Substrate	Expressionsort	Induzierbarkeit durch SA und BA	Enzym-Typ
N.sua.BSMT2-1	<i>N. suaveolens</i>	1164	387	43,7	2-Methoxy-BA; BA > SA	Blüte; Blätter ^a	nicht induzierbar	BSMT-Typ-2
N.sua.BSMT3-1	<i>N. suaveolens</i>	833 unvollständig	277	unbekannt	unbekannt	Blüte; Blätter; Spross ^a	unbekannt	BSMT-Typ-3
N.sua.BSMT1-2	<i>N. suaveolens</i>	1164 (vermutlich ein Pseudogen)	387	39,9	Keine Aktivität	unbekannt	unbekannt	BSMT-Typ-1
N.sua.SAMT1	<i>N. suaveolens</i>	1077	358	40,7	SA>>BA	Wurzeln ^a	unbekannt	-
N.ala.BSMT2-1	<i>N. alata</i>	1164	387	43,5	2-Methoxy-BA; BA > SA	Blüte; Blätter; Spross	nicht induzierbar	BSMT-Typ-2
N.ala.BSMT3-1	<i>N. alata</i>	421 unvollständig	140	unbekannt	unbekannt	Blüte; Blätter; Spross ^a	unbekannt	BSMT-Typ-3
N.ala.SAMT1	<i>N. alata</i>	1077	358	40,7	SA>BA	Blüte; Blätter; Spross; Wurzel	Induzierbar durch SA	-
N.syl.BSMT2-1	<i>N. sylvestris</i>	1161	386	43,4	BA>>SA	Blätter>Blüten; Spross; Wurzel	nicht induzierbar	BSMT-Typ-2
N.syl.SAMT1	<i>N. sylvestris</i>	1077	358	40,7	SA>>BA	Wurzel	Induzierbar durch SA	-
N.tom.BSMT2-1	<i>N. tomentosiformis</i>	579 unvollständig	192	unbekannt	unbekannt	Blätter	unbekannt	BSMT-Typ-2

^(a) Anja Zeissler, unveröffentlicht).

Tab. 3.3: Übersicht über die Substratspezifität der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT- und SAMT-Sequenzen, im Vergleich mit bereits beschriebenen Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen.

Es sind jeweils die relativen Enzymaktivitäten (in Prozent) bezogen auf des am besten umgesetzte Substrat (100 %) angegeben. Sofern keine Umsätze nachweisbar waren, beträgt der Wert 0. Nicht getestete Substrate wurden als „nicht definiert“ (nd) bezeichnet. Es ist zu erkennen, dass die SAMTs die höchste relative Enzymaktivität mit Salizylsäure zeigen, während die BSMTs Benzoessäure als Substrat bevorzugen. Eine Ausnahme stellt die N.gos.NAMT1-1 dar, die obwohl sie aufgrund ihrer Sequenz zu den BSMT-ähnlichen Enzymen gehört, fast keine Benzoessäure als Substrat nutzt.

	Am. SAMT	Ch. SAMT	P.h. BSMT1	P.h. BSMT2	H.c. SAMT	N.sua. SAMT1	Nala. SAMT1	N.syl. SAMT1	D.w. SAMT	C.n. SAMT	S.f. SAMT	Al. BSMT1	Al. BSMT1	N.sua. BSMT1-1	N.syl. BSMT2-1	Nala. BSMT2-1	N.sua. BSMT2-1	N.gos. NAMT1-1	Am. SAMT
Salizylsäure	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	16	46	21,28	3,25	13,41	20,65	20,7	0
Benzoessäure	45	69	16,3	27,3	12,9	5,26	37,82	3,78	2,88	0,28	31,9	100	100	100	100	66,18	81,89	0,9	100
3-OH-BS	0	<2	0,65	1,32	1,3	0,63	7,95	0,54	7,74	0,75	75,6	0	54	13,9	86,51	0,91	5,00	0,5	0
4-OH-BS	0	0	nd	nd	0	0,07	0,17	0,04	0,00	0	34	0	0	75,88	13,66	0,24	2,91	0	0
2,3-OH-BS	nd	nd	nd	nd	48,1	21,67	52,5	14,40	42,88	6,84	99,5	nd	nd	13,6	10,29	3,44	4,97	0,6	nd
2,4-OH-BS	nd	nd	nd	nd	1,3	3,15	21,94	2,27	2,81	1,4	98,5	nd	nd	16,89	0,43	0,45	0,90	0	nd
2,5-OH-BS	nd	nd	nd	nd	25,6	14,70	61,27	9,38	33,94	5,83	1,5	nd	nd	0,84	1,67	0,57	0,65	0	nd
2,6-OH-BS	nd	nd	nd	nd	0	0,31	0,31	0,34	0	0	1,0	nd	nd	0,1	0,49	0,21	0,20	0	nd
3,4-OH-BS	nd	nd	nd	nd	0	0,02	0,22	0,05	0	0	27,9	nd	nd	4,23	26,31	0,06	0,70	0	nd
3,5-OH-BS	nd	nd	nd	nd	0	0,08	0,67	0,05	0	0	2,5	nd	nd	0,24	13,17	0,21	0,26	0	nd
Zimtsäure	0	<2	0,41	0,69	0	0,02	0,33	0,03	0	0	34,5	0	0	15,25	2,28	0,07	0,48	0,8	0
2-OH-ZS	0	nd	0,14	0,25	0	0,07	0,76	0,13	0	0	25	nd	nd	19,8	4,0	0,32	0,32	0	0
3-OH-ZS	0	nd	0,24	0,5	0	0,00	0,03	0,05	0	0	23,8	nd	nd	3,42	3,26	0,11	0,22	0,5	0
4-OH-ZS	nd	nd	nd	nd	0	0,02	0,04	0,01	0	0	4,4	nd	nd	1,04	0,94	0,1	0,23	0	nd
2-Methoxy-BS	nd	nd	nd	nd	0	0,18	1,61	0,12	0	0	nd	nd	nd	83,61	22,93	100	100	0	nd
Anthrakisäure	nd	nd	nd	nd	nd	1,55	nd	1,15	0	2,86	nd	nd	nd	nd	nd	26,21	18,27	1,6	nd
Jasmonsäure	nd	nd	nd	nd	nd	0,04	0	0,03	2,16	0	nd	nd	nd	4,96	1,01	0,36	2,85	0	nd
Nikotinsäure	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	nd	nd	nd	<1	<1	<1	<1	100	nd

Tab. 3.4: Übersicht der für die Substratbindung wichtigen Aminosäuren, der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT- und SAMT-Sequenzen, im Vergleich mit bereits beschriebenen Salizylsäure- und Benzoesäure-Carboxyl-Methyltransferasen.

Die Aminosäuren des aktiven Zentrums der Salizylsäure- und Benzoesäure-Carboxyl-Methyltransferasen wurden auf die für die Substratbindung der SAMT von *C. breweri* (C.b.SAMT) wichtigen Aminosäuren bezogen (Zubieta et al., 2003). Es wurden sowohl die für die SAM-Bindung wichtigen Aminosäuren (oben), wie auch die für die SA- und BA-Bindung wichtigen Aminosäuren (unten) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die für die SAM-Bindung wichtigen Aminosäuren in allen Enzymen hoch konserviert sind. Während die für die SA- und BA-Bindung wichtigen Aminosäuren der Enzyme des SAMT-Typs hoch konserviert sind, zeigen die entsprechenden Aminosäuren der Enzyme des BAMT-Typs eine höhere Variabilität. Die im Vergleich zu der SAMT von *C. breweri* (C.b.SAMT) abweichenden Aminosäuren wurden hervorgehoben.

SAMT-Typ											BAMT-Typ										
C.b. SAMT	A.m. SAMT	Ph. BSMT1	Ph. BSMT2	H.c. SAMT	S.i. SAMT	D.w. SAMT	C.n. SAMT	N.sua. SAMT1	N.sp. SAMT1	N.a. SAMT1	N.ab. SAMT1	Al. BSMT1	Al. BSMT1	A.m. BAMT	N.t. SAMT1	N.sua. BSMT1-1	N.sua. BSMT2-1	N.sp. BSMT2-1	N.a. BSMT2-1	N.gos. NAMT1-1	
Lys 10	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Met	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	
Ser 22	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	
Asp 57	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	
Asp 98	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	
Leu 99	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
Ser 129	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	
Phe 130	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	
Gln 25	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Ala	Gln	Gln	Ala	Gln	
Tyr 147	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	
Met 150	Met	Met	Met	Met	Met	Met	Met	Met	Met	Met	Met	His	His	His	His	His	His	His	His	His	
Trp 151	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	
Leu 210	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Asn	Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Met	
Ile 225	Ile	Ile	Ile	Val	Ala	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Phe	Phe	Ile	Leu	Val	Val	Val	Val	Leu	
Trp 226	Trp	Trp	Trp	Trp	Leu	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Leu	
Tyr 255	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	
Met 308	Met	Met	Met	Met	Val	Met	Met	Met	Met	Met	Met	Ile	Ile	Val	Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Met	
Val 311	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Ile	Phe	Val	Val	Val	Leu	Tyr	
Phe 347	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Tyr	Cys	Ser	Phe	Phe	Phe	Cys	

4. Diskussion

Methylsalizylat und Methylbenzoat stellen häufige Verbindungen im Blütenduft einer Vielzahl von Pflanzen dar (Effmert et al., 2005; Knudsen et al., 2006). Ihre Funktion wird dabei in der Anlockung von Bestäubern gesehen, wodurch sie direkt für die Reproduktion der Pflanzen von Bedeutung sind. Zusätzlich zur Salizylsäure konnte zudem für Methylsalizylat mehrfach ein Einfluss bei der Pathogenabwehr von Pflanzen beschrieben werden (Dudareva et al., 2000; Kessler und Baldwin, 2001; Pichersky und Gershenzon, 2002; Piechulla und Pott, 2003). Hierbei dient es vermutlich als mobiles Signal für die Auslösung der SAR in nicht infiziertem Gewebe (Park et al., 2007). Die Diskrepanz der unterschiedlichen Identitäten und Substratspezifitäten von verschiedenen SAMTs aus Solanaceae zu der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* führten zu der Vermutung, dass es neben den SAMTs noch BSMT-ähnliche Sequenzen in verschiedenen *Nicotiana*-Arten geben könnte. Hierbei stellte sich vor allem die Frage, welche Substratspezifität diese Enzyme besitzen würden. Es bestand die Vermutung, dass entsprechende Sequenzen möglicherweise für Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferasen oder Anthranilsäure-Carboxyl-Methyltransferasen kodieren könnten, da die N.sua.BSMT1-1 auch in der Lage ist, diese Verbindungen in bedeutenden Quantitäten zu synthetisieren (Hippauf, 2004; Pott et al., 2004). Methyljasmonat konnte bereits in *N. attenuata* nachgewiesen werden (Dahl und Baldwin, 2004). Es besitzt ebenso wie Methylsalizylat einen Einfluss bei der Pathogenabwehr. Es wurde mehrfach gezeigt, dass Methyljasmonat ebenso wie Jasmonsäure zur Induzierung von Proteinase-Inhibitoren in Tomaten und zur Nikotinsynthese bei Tabak führen kann (Farmer et al., 1992; Avdiushko et al., 1995; Zhang et al., 1997; Zhang und Baldwin, 1997; Baldwin und Hamilton, 2000; Shoji et al., 2000; Li et al., 2002). Es wird vermutet, dass Methyljasmonat am Wirkort durch eine Esterase wieder zu Jasmonsäure umgesetzt werden könnte. Ein entsprechendes Enzym konnte bereits aus Tomaten isoliert werden (Stuhlfelder et al., 2004).

Eine weitere Vermutung bestand darin, dass die BSMT-ähnlichen Sequenzen für Enzyme kodieren, die ebenso wie die SAMTs eine höhere Präferenz mit Salizylsäure- oder aber wie die N.sua.BSMT1-1 mit Benzoessäure als Substrat zeigen. Im letzteren Fall wäre es außerordentlich überraschend, da Methylbenzoat in Blättern noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden konnte.

4.1 Isolation von SAMT- und BSMT-Sequenzen und deren phylogenetische Einordnung

Die Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen fand vorwiegend auf genomischer Ebene statt. Die umfangreichsten Untersuchungen wurden dazu bei *N. suaveolens* durchgeführt. Die hier isolierten Sequenzen dienten als Ausgangspunkt für die gezielte Suche orthologer Sequenzen in *N. alata* und *N. sylvestris*.

Von Todd Barkman (Western Michigan University) wurden Teile potentieller SAMTs aus *N. sylvestris* und *N. alata* zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Sequenzen wurden mit zusätzlichen Introns auf genomischer Ebene isoliert. Durch vorherige Salizylsäurebehandlung konnte die Expression dieser Teilsequenzen in Blättern nachgewiesen werden (persönliche Information; nicht gezeigt).

Die Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen auf genomischer Ebene von *N. suaveolens* lieferte 11 unterschiedliche Fragmente, die auf das Vorkommen von mindestens 7 verschiedenen BSMT-ähnlichen Genen schließen lassen. Ein weiteres Fragment konnte durch RT-PCR isoliert werden, wodurch sich die Zahl der BSMT-ähnlichen Gene in *N. suaveolens* auf mindestens 8 erhöht. Hierbei lassen sich die BSMT-ähnlichen Gene in 3 Typen (entsprechend BSMT-Typ-1; BSMT-Typ-2; BSMT-Typ-3) einteilen. Zu dem BSMT-Typ-1, für den beispielhaft die blütenspezifische N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* steht, können die Fragmente 1–4 und 6-9 gezählt werden. Die Exons dieser Sequenzen besitzen nur wenige Nukleotidaustausche zueinander. Des Weiteren sind die ersten Introns der Fragmente 4 und 6 identisch. Das Intron des Fragments 9 wies im Vergleich zu den ersten Introns von Fragment 4 und 6 lediglich 4 Austausche auf. Da das Fragment 9 nur eine unvollständige Version der Fragmente 4 bzw. 6 darstellt, ist zu vermuten, dass es sich hier um ein Pseudogen handeln könnte. Die Fragmente 1–3 stimmten mit der codierenden Sequenz der N.sua.BSMT1-1 überein. Inwieweit es sich bei ihnen um Teile intakter Gene handelt oder ob sie Retro-Pseudogene darstellen, ist unbekannt.

Zu dem BSMT-Typ-2 können die Fragmente 5, 10 und 11 gerechnet werden. Das Intron des Fragments 5 ist um 151 bp größer als die Introns der Fragmente 4, 6 und 9. Die codierende Sequenz besitzt hohe Identität zu den Fragmenten 10 und 11. Die Expression eines dieser Fragmente konnte durch RT-PCR mit Blatt-RNA von *N. suaveolens* nachgewiesen werden. Ein markanter Unterschied zur blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 besteht in einer 93-96 Nukleotid langen Insertion nahe dem 3'Ende der codierenden Sequenz. Aufgrund dieser Insertion im codierenden Bereich kann der BSMT-Typ-2 direkt vom BSMT-Typ-1 unterschieden werden. Es ist denkbar, dass das Fragment 5 zu einem der Gene gehört, welche

die Fragmente 10 und 11 lieferten. Das bedeutet, dass durch die 3 Fragmente nur auf die Existenz von maximal zwei unterschiedlichen Genen geschlossen werden kann. Orthologe Sequenzen von Enzymen des BSMT-Typ-2 wurden auch aus *N. alata* (N.ala.BSMT2-1) und *N. sylvestris* (N.syl.BSMT2-1) isoliert. Auch sie besitzen im Vergleich zu der N.sua.BSMT1-1 eine Insertion nahe dem 3' Ende. Bei der N.ala.BSMT2-1 beträgt sie ebenso wie bei der N.sua.BSMT2-1 96 Nukleotide, während sie bei der N.syl.BSMT2-1 um ein Codon verkürzt ist und nur 93 Nukleotide umfasst.

Der BSMT-Typ-3 wird durch das Fragment 12 repräsentiert. Diese Sequenz unterscheidet sich von denen der ersten beiden Typen durch kurze verstreute Insertionen und Deletionen. Sie wurde nur im Rahmen der RT-PCR und nicht auf genomischer Ebene nachgewiesen. Da der gesamte codierende Bereich *bis dato* noch nicht bekannt ist, können noch keine Aussagen über eine zusätzliche Insertion, wie es beim BSMT-Typ-2 der Fall ist, getroffen werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei *N. suaveolens* um eine allotetraploide Pflanze handelt ist es denkbar, dass sich das durch dieses Gen codierte Enzym ebenfalls dem BSMT-Typ-1 zuordnen lässt. Phylogenetische Untersuchungen der bereits aus Solanaceae identifizierten BSMT-Sequenzen unterstützen diese Vermutung (Abb. 4.2). Es wäre denkbar, dass diese Sequenz durch Hybridisierung vom zweiten Elternteil beigesteuert wurde. Da dies *bis dato* jedoch noch völlig unklar ist, wurde sie **vorerst** einem dritten Typ (BSMT-Typ-3) zugeordnet und als N.sua.BSMT3-1 bezeichnet. Zusätzlich zu der N.sua.BSMT3-1 konnte eine orthologe Sequenz aus *N. alata* (N.ala.BSMT3-1) isoliert werden.

Eine Ursache für die hohe Zahl an unterschiedlichen Fragmenten liegt vermutlich in der evolutionären Entstehung der Gattung *Nicotiana*. Es wird davon ausgegangen, dass die frühen Vertreter dieser Gattung durch die Hybridisierung von 6 Chromosomenpaar tragenden Vorfahren entstanden sind (Goodspeed, 1954; Chase et al., 2003). Durch weitere Hybridisierungsereignisse dieser Arten untereinander mit einer oft daran anschließenden Dysploidy, wurde der modern amphiploide Charakter vieler heutiger *Nicotiana*-Arten geprägt (Reed, 1991; Aoki und Ito, 2000). *Nicotiana suaveolens* besitzt 16 Chromosomenpaare und ist vermutlich durch Amphiploidy aus einem noctifloroiden Vorfahren und einem 10 Chromosomenpaar tragenden alatoiden Vorfahren, gefolgt von anschließender Chromosomenreduktion, entstanden (Reed, 1991; Chase et al., 2003). Unter der Voraussetzung, dass die BSMT-ähnlichen Sequenzen schon sehr früh in der Entstehung der Gattung *Nicotiana* vorhanden waren, wäre es bei allen Hybridisierungen zu einer Erhöhung der Gesamtzahl an BSMT-ähnlichen Genen gekommen. Diese Theorie wird von der kürzlichen Entdeckung BSMT-ähnlicher Sequenzen in neun weiteren Solanaceae-Arten

gestützt (Martins et al., 2007). Isolierte Teilsequenzen potentieller BSMTs stammten beispielsweise aus *Brunfelsia*, *Schwenckia*, *Protoschwenckia*, *Datura wrightii*, *Cestrum nocturnum* und *C. elegans*. Außerhalb der Solanaceaeen wurden bisher keine orthologen Sequenzen isoliert, was für eine frühe Entwicklung der BSMT-ähnlichen Gene in der Evolution dieser Pflanzenfamilie spricht (Barkman, persönliche Information).

In welcher Verwandtschaftsbeziehung die gefundenen BSMT-ähnlichen Sequenzen aus *N. suaveolens* zueinander stehen, ist schwer zu sagen. Der Grund liegt darin, dass noch Unklarheit darüber besteht, wie viele weitere BSMT-ähnliche Sequenzen insgesamt im Genom von *N. suaveolens* existieren. Des Weiteren ist es von Nachteil, dass bisher nur eine geringe Anzahl an ähnlichen Sequenzen aus nahe verwandten Arten isoliert wurde, wodurch sich vergleichende Untersuchungen schwierig gestalten. Dennoch ist es unter den bisherigen Erkenntnissen möglich, anhand der gefundenen Sequenzen Hypothesen über die Verwandtschaftsbeziehungen aufzustellen.

Die Ähnlichkeiten zwischen *N. suaveolens*-Fragment 4 und 6 weisen darauf hin, dass sie sehr eng miteinander verwandt sind (siehe Abb. 3.1). Es ist denkbar, dass eine dieser Sequenzen durch Duplikation aus der anderen entstanden ist, oder dass sie durch Hybridisierung verwandter *Nicotiana*-Arten zusammengekommen sind. Es kann vermutet werden, dass das Gen, von dem das *N. suaveolens*-Fragment 4 erhalten wurde, für die blütenspezifische N.sua.BSMT1-1 kodiert. Die Sequenz des *N. suaveolens*-Fragments 6 wurde in geringen Mengen auch nach RT-PCRs gefunden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte 3'RACE blieb allerdings erfolglos. Es ist anzunehmen, dass diese Sequenz nicht- oder nur in sehr geringem Umfang exprimiert wird. Möglicherweise handelt es sich aber auch lediglich um eine genomische Verunreinigung. Hierfür könnte die durch *N. suaveolens*-Fragment 8 repräsentierte Sequenz verantwortlich sein, bei der es sich vermutlich um ein Retro-Pseudogen handelt (Abb. 3.1). Es ist denkbar, dass dieses aus Transkripten des Gens entstanden ist, von dem das *N. suaveolens*-Fragment 6 isoliert wurde. Konsequenterweise würde das jedoch bedeuten, dass dieses Gen zumindest in früheren Zeiten transkribiert worden sein muss. Diese Vermutung kann dadurch gestützt werden, dass die in Blüten exprimierte N.gos.NAMT1-1 aus *N. gossei* eine höhere Ähnlichkeit zu der Sequenz der *N. suaveolens*-Fragmente 6-8 aufweist als zu der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* (nicht gezeigt). Während sich die N.gos.NAMT1-1 auf Aminosäureebene durch 13 Austausche von der N.sua.BSMT1-1 unterscheidet, sind es zu *N. suaveolens*-Fragment 8 lediglich 5 Austausche. Somit könnte die N.gos.NAMT1-1 in *N. gossei* möglicherweise das orthologe Gen zu dem durch Fragment 6 repräsentierten Gen darstellen.

Die *N. suaveolens*-Fragmente 5, 10 und 11 stellen einen zweiten BSMT-Typ (BSMT-Typ-2) dar. Dieser Typ lässt sich, wie bereits beschrieben, aufgrund seiner Länge deutlich vom BSMT-Typ-1, zu dem die *N.sua.BSMT1-1* zählt, unterscheiden. Es wäre denkbar, dass der BSMT-Typ-1 direkt durch ein Duplikationsereignis mit anschließender Deletion aus dem BSMT-Typ-2 entstanden sein könnte. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass der BSMT-Typ-1 direkt durch eine Deletion aus dem BSMT-Typ-2 entstanden ist. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, dass beide Typen aus der Duplikation einer BSMT-ähnlichen Sequenz eines gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen sind. Dies würde bedeuten, dass beide Typen in der Mehrzahl der *Nicotiana*-Arten zu finden sein sollten. Antworten auf diese Fragen könnten Untersuchungen der genauen Verteilung dieser Enzyme in den unterschiedlichen *Nicotiana*-Sektionen geben. Hierfür ist allerdings die genaue Kenntnis der Verwandtschaftsbeziehungen der verschiedenen *Nicotiana*-Arten von großer Bedeutung. Andererseits könnten derartige Untersuchungen tiefere Einblicke in die Verwandtschaft einzelner *Nicotiana*-Arten zueinander vermitteln.

Die genauen Vorfahren sind *bis dato* nur für wenige *Nicotiana*-Arten bekannt. Es wird angenommen, dass *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* die Eltern von *N. tabacum* darstellen und *N. rustica* aus der Hybridisierung von *N. paniculata* und *N. undulata* hervorgegangen ist (Reed, 1991; Kitamura et al., 2001).

Der Ursprung der Sektion *Suaveolentes* ist nach wie vor unklar. Es wird davon ausgegangen, dass ein Elternteil ein Vorfahre der heutigen Sektion *Alatae* ist (Chase et al., 2003). Goodspeed vermutete, dass es sich beim zweiten Elternteil um einen acuminatoiden- oder noctifloroiden Vorfahren handeln könnte. Die Beteiligung eines acuminatoiden Vorfahren wird aufgrund der Ergebnisse von genomischen *in situ* Hybridisierungen (GISH) mittlerweile angezweifelt (Chase et al., 2003).

Interessanterweise scheint die Emission von Methylbenzoat und Methylsalizylat in größeren Mengen im Blütenduft auf einzelne Arten der Sektion *Suaveolentes* beschränkt zu sein (Raguso et al., 2003a; Raguso et al., 2006). Neben *N. suaveolens* wurde noch eine hohe Emission von Methylbenzoat in der nahe verwandten Art *N. cavicola* nachgewiesen (Raguso et al., 2006). *N. gossei* emittiert neben Methylsalizylat vor allem Methylnikotinat (Barkman; persönliche Information). Daher stellt sich die Frage, ob die Fähigkeit zur Emission von Methylbenzoat, Methylsalizylat und Methylnikotinat direkt mit der Entstehung des BSMT-Typ-1 gekoppelt ist. Das würde bedeuten, dass sich dieser Enzymtyp erst innerhalb der Sektion *Suaveolentes* nach dessen Abspaltung entwickelt hat. Neuste Ergebnisse sprechen allerdings gegen diese Theorie. Es wurde kürzlich ein Enzym mit 80 %iger Identität zur

N.sua.BSMT1-1 aus *N. tabacum* isoliert (Park et al., 2007). Das Enzym wurde als N.t.SAMT1 bezeichnet und es konnte gezeigt werden, dass es von Bedeutung für Induktion der SAR in *N. tabacum* ist (Park et al., 2007). Die Existenz dieses Enzyms in *N. tabacum* und das Wissen um deren Eltern zeigt, dass es bereits in *N. sylvestris* oder *N. tomentosiformis* vorkommen muss und somit Enzyme des BSMT-Typ-1 bereits vor der Entstehung der Sektion *Suaveolentes* vorhanden waren.

Zusätzlich zu den BSMT-ähnlichen Sequenzen konnten SAMT-ähnliche Sequenzen isoliert werden. Die SAMTs aus *N. alata* (N.ala.SAMT1) und *N. sylvestris* (N.syl.SAMT1) wurden in der Arbeitsgruppe von Todd Barkman (Western Michigan University) isoliert und im Rahmen dieser Arbeit komplettiert. Zudem konnte eine weitere SAMT-Sequenz aus *N. suaveolens* (N.sua.SAMT1) isoliert werden. Die SAMT-Sequenzen zeigen Identitäten von über 93 % zueinander und lassen sich deutlich von den BSMT-Sequenzen mit Identitäten von 58,9 % - 61,2 % unterscheiden (Tab. 6.1). Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit nur jeweils eine SAMT-Sequenz pro untersuchter *Nicotiana*-Art isoliert wurde, so ist doch zu vermuten, dass es noch weitere dieser Sequenzen in dem Genom der drei Arten geben sollte. In *N. tabacum* konnten auf genomischer Ebene insgesamt zwei SAMT-Sequenzen nachgewiesen werden, wobei jedoch nur eine dieser Gene exprimiert wurde (Martins und Barkman, 2005). In der Solanaceae *Petunia hybrida* wurden ebenfalls zwei SAMTs, die als P.h.BSMT1 und P.h.BSMT2 bezeichnet wurden, isoliert und charakterisiert (Negre et al., 2003). Auch in anderen Familien wurden mehrere SAMTs isoliert oder zumindest vermutet. In *Hoya carnosa* konnte die Expression von zwei SAMTs gezeigt werden und Southernblots, die bei der nahe verwandten Art *Stephanotis floribunda* durchgeführt wurden, ließen ebenfalls die Existenz von mindestens zwei SAMTs vermuten (Henning, 2002; Pott, 2003; Heidebrecht, 2005; Kreitsch, 2006).

Die genomischen Sequenzen der Solanaceae-SAMTs waren kürzlich Bestandteil umfangreicher Untersuchungen (Martins und Barkman, 2005). Alle auf genomischer Ebene isolierten SAMTs besaßen 4 Exons und 3 Introns. Die Intronposition war bei allen Sequenzen identisch, wobei die Intronlänge stark variierte. Die kürzesten Introns mit Längen von 205 bp; 73 bp und 286 bp wurden bei der SAMT von *Cestrum nocturnum* gefunden. Die längsten Introns mit 670 bp, 482 bp und 705 bp besaß die SAMT von *N. sylvestris* (N.syl.SAMT1). Die Längen der codierenden Bereiche der SAMTs betragen ca. 1077 Nukleotide. Die Exons hatten somit Längen von 75 bp, 405 bp, 255 bp und 342 bp. Analoge Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit für die BSMT-ähnlichen Sequenzen erhalten. Auch sie scheinen 3 Introns zu besitzen. Die Lage der ersten zwei Introns im Gen ist identisch mit denen der

SAMTs. Die Position des dritten Introns konnte nicht vollständig bestimmt werden. Sie lässt sich aber auf den Bereich des dritten Introns der SAMTs eingrenzen. Neben der genomischen Sequenz für verschiedene Solanaceaeen-SAMTs konnte bereits die genomische Sequenz einer SAMT aus *S. floribunda* ermittelt werden (Henning, 2002). Die S.f.SAMT besitzt ebenfalls drei Introns. Die Lage der Introns im Gen ist mit der, der Solanaceaeen-SAMTs und *Nicotiana*-BSMTs identisch. In *A. thaliana* sind bereits die genomischen Sequenzen der einzelnen Mitglieder der SABATH-Familie (siehe 1.2 und 1.2.1) beschrieben worden (D'Auria et al., 2003). Sie enthalten maximal 4 Introns, die an 5 verschiedenen Positionen innerhalb der Gene vorkommen können. Die Mehrheit der Gene der SABATH-Familie aus *A. thaliana* besitzt jedoch zwei bzw. drei Introns. Bisher konnte innerhalb dieser Familie eine BSMT isoliert werden (Chen et al., 2003). Das als At3g11480 bezeichnete Gen der A.t.BSMT1 enthält 4 Introns an der ersten-, zweiten-, vierten- und fünften möglichen Intronposition. An der ersten Intronposition werden neben der A.t.BSMT1 nur noch in zwei weiteren Genen der SABATH-Familie aus *A. thaliana* Introns gefunden. In der genomischen SAMT-Sequenz aus *S. floribunda* und den genomischen SAMT-Sequenzen der Solanaceaeen, bzw. der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMTs befinden sich keine Introns an dieser Position. Die restlichen drei Intronpositionen der A.t.BSMT1 stimmen mit denen der Introns der SAMT aus *S. floribunda* und den SAMT- und BSMT-Sequenzen der verschiedenen *Nicotiana*- bzw. Solanaceaeen-Arten überein (Henning, 2002; Pott, 2003; Martins und Barkman, 2005). Die identische Lage der Introns ist vermutlich auf den gemeinsamen Ursprung der Gene der SABATH-Familie zurückzuführen.

In Abb. 4.1 wird ein Stammbaum dargestellt, der verschiedene bereits beschriebene Mitglieder der SABATH-Familie darstellt. Besondere Bedeutung wurde dabei auf die Salizylsäure- und Benzoessäure methylierenden Enzyme gelegt. Es ist zu erkennen, dass die Solanaceaeen-SAMTs die größte Verwandtschaft zu den *Nicotiana*-BSMTs aufweisen, jedoch beide Enzymtypen eine eigene Gruppe bilden. Eine geringere Verwandtschaft besteht zu den SAMTs und BSMTs anderer Familien, wie den SAMTs aus *S. floribunda* und *H. carnosus* oder den BSMTs aus *A. thaliana* und *A. lyrata*. In einem zweiten Stammbaum (Abb. 4.2) wurden nur die Solanaceaeen-SAMTs und -BSMTs aufgenommen. Außerdem wurden in diesem Stammbaum auch die bisher unvollständigen Sequenzen mit einbezogen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen eindeutig auf einen gemeinsamen Ursprung der *Nicotiana*-SAMTs und -BSMTs schließen. Des Weiteren wird deutlich, dass es sich hier um eine konvergente Evolution handelt und die *Nicotiana*-SAMTs und -BSMTs zueinander paralog sind. Die SAMTs der untersuchten *Nicotiana* Arten scheinen

untereinander ortholog zu sein, während bei den BSMTs zwischen mehreren Typen unterschieden werden muss. Die verschiedenen Typen sind zueinander paralog, während sie wiederum untereinander vermutlich ortholog sind. Dies ist am eindeutigsten bei dem BSMT-Typ-2 zu erkennen, da er sich durch eine Insertion am 3'Ende der codierenden Region zweifelsfrei von dem BSMT-Typ-1 unterscheiden lässt.

Ob sich die einzelnen Enzymtypen neben ihrer Sequenz auch durch ihrer Substratspezifität voneinander abgrenzen ließen, sollte durch Untersuchungen mit den überexprimierten Enzymen geklärt werden.

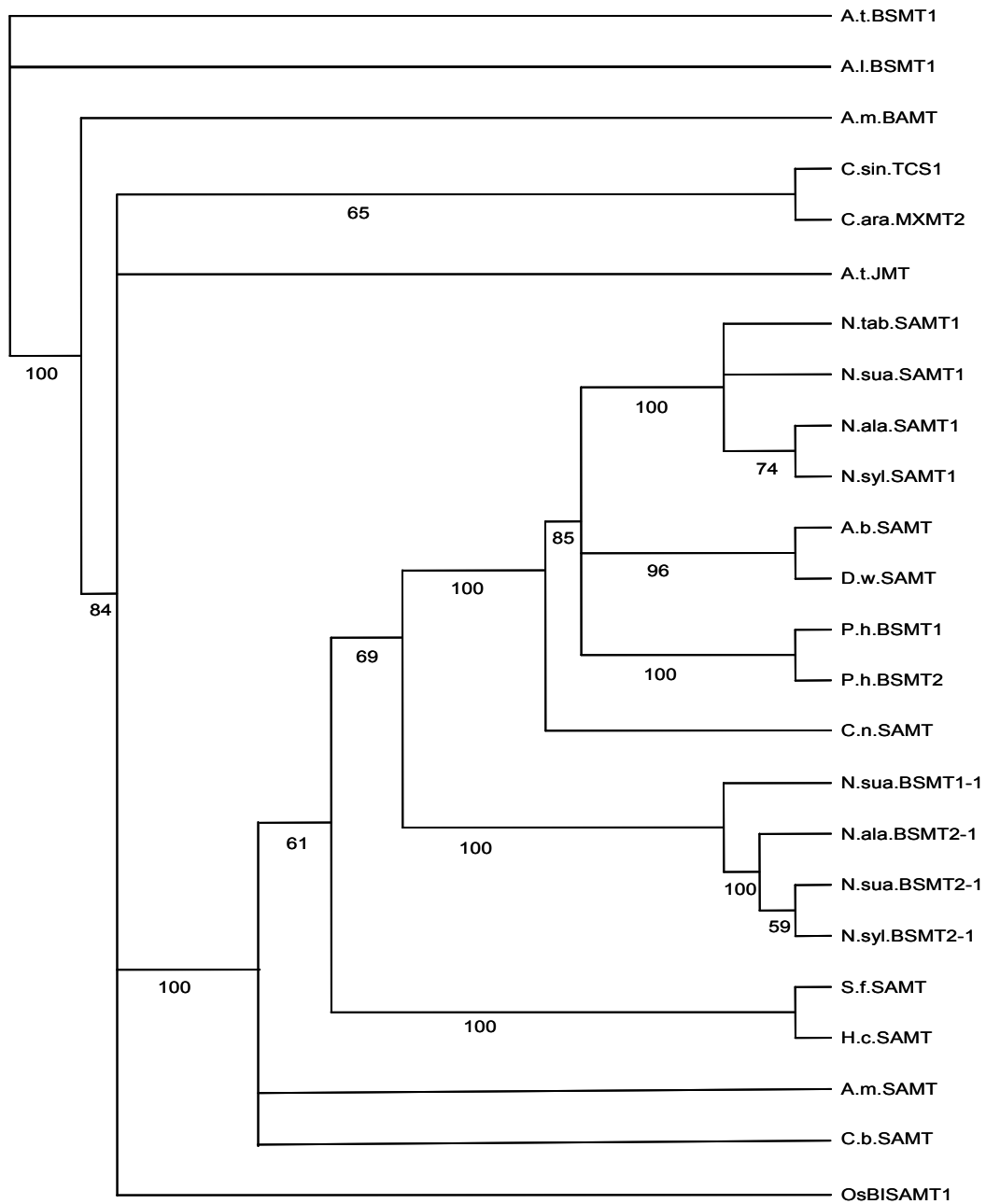


Abbildung 4.1: Stammbaum von pflanzlichen Carboxyl-Methyltransferasen.

Der Baum wurde mit PAUP*4.0 (Swofford, 2003) und der „neighbour-joining“-Methode erstellt. Alle Bootstrap-Werte > 50 sind unter den Zweigen angegeben. Es ist zu erkennen, dass die im Rahmen dieser Arbeit isolierten SAMTs und BSMTs durch „echte Verzweigungen“ voneinander getrennt sind und es sich bei ihnen somit um paraloge Gene handelt.

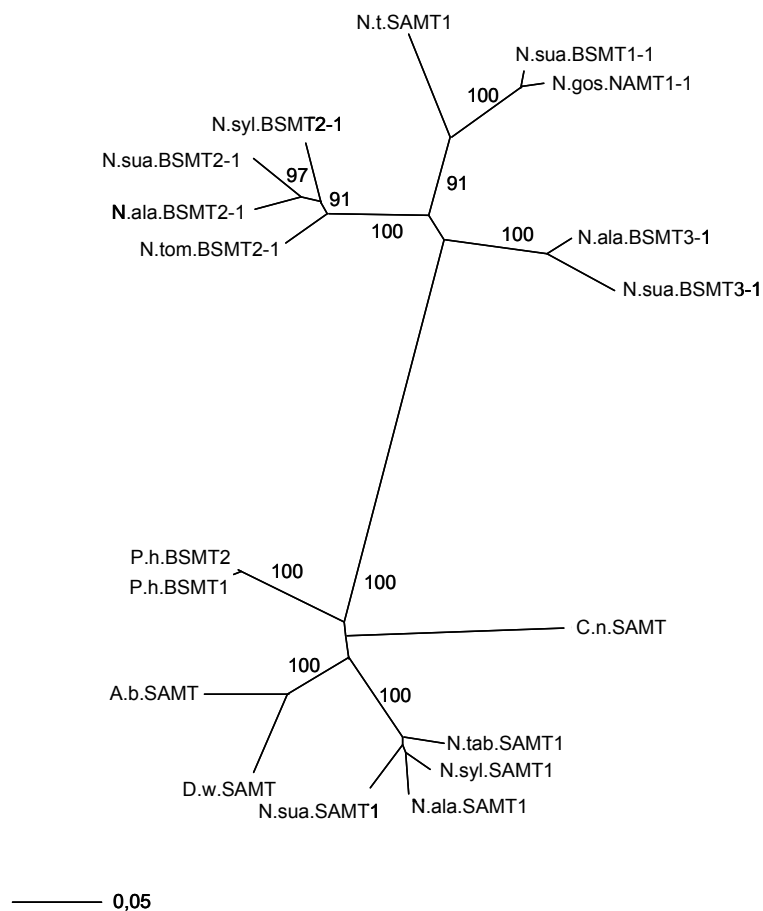


Abbildung 4.2: Stammbaum von von SAMTs und BSMTs aus verschiedenen Solanaceae.

Der Baum wurde mit PAUP*4.0 (Swofford, 2003) und der „neighbour-joining“-Methode erstellt. Alle Bootstrap-Werte > 50 sind angegeben. Es ist zu erkennen, dass die im Rahmen dieser Arbeit isolierten SAMTs und BSMTs durch „echte Verzweigungen“ voneinander getrennt sind und es sich bei ihnen somit um paraloge Gene handelt. Weiterhin soll verdeutlicht werden, dass sich die *Nicotiana*-BSMTs in unterschiedliche Typen einteilen lassen, wobei sich die Enzyme vom BSMT-Typ-2 deutlich von denen des BSMT-Typ-1 und BSMT-Typ-3 unterscheiden lassen. Die Trennung zwischen den Enzymen des BSMT-Typ-1 und BSMT-Typ-3 ist aufgrund von geringen Bootstrap-Werten unter 50 % relativ unsicher. Die Kompletterierung der codierenden Regionen der Enzyme des BSMT-Typ-3 wird zeigen, ob die Unterteilung der BSMTs in drei Typen gerechtfertigt ist, oder ob sich die Enzyme des jetzigen BSMT-Typ-3 ebenfalls dem BSMT-Typ-1 zuordnen lassen.

4.2 Überexpression und Bestimmung der Substratspezifität der BSMTs und SAMTs

Bereits in den letzten Jahren konnten mehrere Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen isoliert und charakterisiert werden (Effmert et al., 2005). Dabei handelt es sich vorwiegend um Enzyme, die für die Synthese dieser Verbindungen als Bestandteile des Blütenduftes von Bedeutung sind. In der Regel sind sie immer in der Lage, sowohl

Salizylsäure wie auch Benzoessäure zu methylieren, wobei sie jedoch eines der Substrate bevorzugen. Dementsprechend wurden sie in SAMT-Typen und BAMT-Typen unterschieden (Effmert et al., 2005). In der Mehrzahl der Pflanzen wurde bisher immer nur einer dieser Typen nachgewiesen. In *A. majus* wurde jedoch bereits ein Enzym des SAMT-Typs und des BAMT-Typs identifiziert und charakterisiert (Murfit et al., 2000; Negre et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in drei verschiedenen *Nicotiana*-Arten jeweils Enzyme des SAMT-Typs, wie auch des BAMT-Typs, nebeneinander vorkommen. Durch die Überexpression dieser Enzyme und der anschließenden Bestimmung ihrer Substratspezifität sollte überprüft werden, ob sich die Unterschiede in den Sequenzen auch in einer veränderten Substratnutzung widerspiegeln und somit deren Zuordnung zu den SAMT-Typen und BAMT-Typen gerechtfertigt ist.

Die SAMTs zeigten zueinander sehr hohe Identitäten von 93,3 % - 96,6 %. Auch zu den bereits aus anderen Solanaceen-Arten isolierten SAMTs bestanden hohe Ähnlichkeiten, die in einem Bereich von 76 % - 86 % lagen (Tab. 6.1). Die Identitäten zu den SAMTs aus *H. carnos*a und *S. floribunda* lagen mit 63,9 % - 67,6 % nur geringfügig höher als die zu den isolierten BSMT2 Sequenzen. Diese rangierten in einem Bereich von 58,6 % - 61,4 %. Dieses Ergebnis weist wiederum auf die nahe Verwandtschaft der, aus den drei *Nicotiana*-Arten isolierten SAMTs und BSMTs hin. Die Substratspezifität aller drei SAMTs war ausgesprochen ähnlich, was sich vermutlich auf die hohe Identität untereinander und dem Besitz der gleichen Aminosäuren im aktiven Zentrum der Enzyme zurückführen lässt. Sie alle besaßen eine hohe Substratspezifität. Die höchste relative Enzymaktivität wurde mit Salizylsäure erreicht, wobei sie jedoch auch 2,3-; 2,4- und 2,5-Dihydroxybenzoessäure als Substrat akzeptierten. 2,3- und 2,5-Dihydroxybenzoessäure wurden gegenüber 2,4-Dihydroxybenzoessäure bevorzugt umgesetzt. In geringerem Umfang als 2,3- und 2,5-Dihydroxybenzoessäure wurde auch immer Benzoessäure als Substrat genutzt. Wie in Tab. 3.3 gezeigt, kann ein ähnliches Muster ebenfalls für die SAMT aus *D. wrightii*, *C. nocturnum* und *H. carnos*a beobachtet werden (Heidebrecht, 2006; Krohn, 2007). Auch die P.h.BSMT1 und P.h.BSMT2 aus *P. hybrida*, die A.b.SAMT aus *A. belladonna* und die C.b.SAMT aus *C. breweri* setzten bevorzugt Salizylsäure um (Ross et al., 1999; Fukami et al., 2002; Negre et al., 2003). Leider wurden bei diesen Enzymen 2,3-; 2,4- und 2,5-Dihydroxybenzoessäure nicht als Substrate getestet, so dass hier keine Aussagen über deren Nutzung getroffen werden können. Es kann aber vermutet werden, dass auch sie in der Lage sind, diese Verbindungen zu methylieren. Ein in seiner Substratspezifität von den oben genannten SAMTs abweichendes Enzym stellt die S.f.SAMT aus *S. floribunda* dar. Sie zeigt nur eine sehr geringe

Substratspezifität, jedoch stellt auch hier die 2,3-Dihydroxybenzoesäure neben der Salizylsäure das am effizientesten methylierte Substrat dar (Pott et al., 2004). Im Unterschied zu den restlichen SAMTs wird hier jedoch die 2,4-Dihydroxybenzoesäure gegenüber der 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Substrat bevorzugt (Pott et al., 2004).

Für die Bestimmung der Substratspezifität wurde der Histidin-Rest von der N.ala.SAMT1 und das SUMO-Protein von der N.sua.SAMT1 und der N.syl.SAMT1 nicht entfernt. Der Grund dafür lag hauptsächlich in der, selbst bei niedrigen Temperaturen, geringen Stabilität der Proteine. Weiterhin haben Untersuchungen an der SAMT aus *D. wrightii* und *C. nocturnum* gezeigt, dass die Enzyme durch den für die Entfernung des SUMO-Proteins benötigten Puffers irreparabel inaktiviert wurden (Krohn, 2007).

Inwiefern durch das Vorhandensein der SUMO-Proteine bzw. der Histidin-Reste an den Proteinen deren Aktivität verändert wurde, ist schwer zu sagen. Für die C.b.SAMT aus *C. breweri* konnte gezeigt werden, dass das mit einem N-terminalen Histidin-Rest versehene Protein einen geringeren K_m -Wert für Salizylsäure aufwies, als das unveränderte Protein, jedoch keine Veränderungen in der Substratspezifität erkennen ließ (Ross et al., 1999). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass der His-tag aufgrund seiner geringen Größe und Ladung kaum einen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt (Terpe, 2003). Somit lässt sich vermuten, dass die für die N.ala.SAMT1 erhaltene Substratspezifität relativ nah an der des Enzyms ohne Histidin-Rest liegen sollte. Die hohe Ähnlichkeit der Substratspezifität der N.ala.SAMT1 mit der N.syl.SAMT1 und der N.sua.SAMT1 lassen in diesen Enzymen ebenfalls einen nur geringen Einfluss des SUMO-Proteins erwarten.

Die untersuchten BSMTs wiesen im Vergleich zu den SAMTs ein deutlich abweichendes Substratspektrum auf. *Bis dato* konnten nur wenige Enzyme des BAMT-Typs isoliert und charakterisiert werden (Effmert et al., 2005). Zu ihnen zählen die A.m.BAMT aus *A. majus*, die BSMTs aus *A. thaliana* und *A. lyrata* sowie die N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens*. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten BSMTs zeigen deutlich höhere Identitäten von 43,7 % - 61,6 % zu den bekannten SAMTs als zu den bereits isolierten BSMTs. Hier betragen die Identitäten nur etwa 30,9 – 39,4 %. Eine Ausnahme stellt die N.sua.BSMT1-1 dar, die zu den hier isolierten *Nicotiana*-BSMTs Identitäten von 74,1 % - 75,8 % aufweist, was auf die nahe Verwandtschaft dieser Enzyme hindeutet (Tab. 6.1). Die Sequenzen der hier charakterisierten BSMTs sind weniger stark konserviert als die der isolierten *Nicotiana*-SAMTs. Alle Enzyme setzten bevorzugt Benzoesäure um. Bei der N.sua.BSMT2-1 und der N.ala.BSMT2-1 stellte die 2-Methoxybenzoesäure das am effizientesten umgesetzte Substrat dar. Bisher gibt es jedoch keine Hinweise darauf, dass dieses Substrat *in planta* von

Bedeutung ist. Während die N.sua.BSMT2-1 und die N.ala.BSMT2-1 ein sehr ähnliches Substratspektrum aufwiesen, wich das Substratspektrum der N.syl.BSMT2-1 stark von diesen ab. Die N.syl.BSMT2-1 zeigte mit 86,5 % eine sehr hohe relative Enzymaktivität mit der 3-Hydroxybenzoesäure, wohingegen die relative Enzymaktivität mit 2-Methoxybenzoesäure im Vergleich zur Benzoesäure deutlich geringer ausfiel. Ob sich diese Veränderungen, wie bereits bei den SAMTs beschrieben, auf die Verwendung eines von der N.ala.BSMT2-1 und N.sua.BSMT2-1 verschiedenen Überexpressionsvektors oder auf Unterschiede in den aktiven Zentren zurückführen lassen, ist nur schwer zu sagen. Die A.t.BSMT1 zeigte mit 54 % eine hohe relative Enzymaktivitäten mit 3-Hydroxybenzoesäure, wohingegen die nahe verwandte A.l.BSMT1 diese Verbindung nicht umsetzte (Chen et al., 2003). Die N.sua.BSMT1-1 konnte ebenfalls mit einer relativen Enzymaktivität von 15,3 % 3-Hydroxybenzoesäure umsetzen, zeigte aber eine bedeutend höhere relative Enzymaktivität von 83,9 % mit 2-Methoxybenzoesäure (Pott et al., 2004). Die A.m.BAMT aus *A. majus* setzte keine dieser Verbindungen um und ist hochspezifisch für Benzoesäure (Murfit et al., 2000). Im Gegensatz zu den SAMTs wurde die 2,3-; 2,4- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure kaum als Substrat akzeptiert. Lediglich mit 2,3-Dihydroxybenzoesäure konnte eine relative Enzymaktivität von 10,3 % bei der N.syl.BSMT2-1 erreicht werden. Da 2,3-; 2,4- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure nicht bei der A.t.BSMT1, der A.l.BSMT1 und der A.m.BAMT getestet wurden, ist hier leider keine Aussage zu der Nutzung dieser Substrate möglich.

Aus den Substratspezifitäten der untersuchten *Nicotiana*-Enzyme geht eindeutig hervor, dass es sich um SAMTs bzw. BSMTs handelt. Des Weiteren konnte ihre Zuordnung zu den SAMT-Typen bzw. den BAMT-Typen bestätigt werden.

Wie zu erwarten, scheint die Hydroxylgruppe der Salizylsäure an ortho-Position von entscheidender Bedeutung für deren Nutzung als Substrat bei den SAMT-Typen zu sein, während sie bei den Enzymen des BAMT-Typs eher einen inhibierenden Einfluss besitzt. Salizylsäure ist in der Lage, eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe an ortho-Position und der Carboxylgruppe zu bilden. Dadurch wird die Möglichkeit der Rotation des Benzylrestes verhindert und eine planare Verbindung geschaffen, die mit der Carboxylgruppe in einer Ebene liegt (Zubieta et al., 2003; Effmert et al., 2005). Die verringerte Beweglichkeit des Benzylrings der Salizylsäure böte die Möglichkeit, auch von sehr „engen“ aktive Zentren effizient gebunden zu werden, wohingegen die weniger starre Benzoesäure „weitere“ aktive Zentren benötigen würde (Effmert et al., 2005; Barkman et al., 2007).

Schon seit längerem stellt sich die Frage, wodurch genau die unterschiedliche Nutzung von Benzoesäure und Salizylsäure bei den Enzymen der SAMT-Typen und BAMT-Typen bedingt wird (Effmert et al., 2005). Durch die Kristallisation der C.b.SAMT aus *C. breweri* konnten die für die Substratbindung wichtigen Aminosäuren identifiziert werden (Zubieta et al., 2003). Es stellte sich heraus, dass durch das Met-150 und Met-308 eine „molekulare Klammer“ gebildet wurde, durch den der Benzylrest der Salizylsäure in eine für die Methylierung geeignete Position gebracht werden konnte. Interessanterweise findet sich das Met-150 bei allen SAMTs, während bei den Enzymen des BSMT-Typs, aber auch bei anderen Carboxyl-Methyltransferasen wie der Auxin-Carboxyl-Methyltransferase, der Gibberelin-Carboxyl-Methyltransferase und der Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase aus *A. thaliana*, an dieser Stelle ein Histidin ist (Seo et al., 2001; Qin et al., 2005; Varbanova et al., 2007). In Barkman et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass innerhalb der SAMTs nur das Met-150 unter positiver Selektion stand. Somit scheint es vor allem für die Bevorzugung der Salizylsäure gegenüber der Benzoesäure als Substrat von Bedeutung zu sein. Diese Vermutung wird auch durch Mutationsuntersuchungen gestützt. Es wurde gezeigt, dass durch den Austausch des Histidins an Position 158 der N.sua.BSMT1-1 gegen ein Methionin, die Enzymaktivität mit Salizylsäure von 0,6 pkat/mg Protein, um das vierfache, auf 2,42 pkat/mg Protein anstieg. Gleichzeitig fiel die Enzymaktivität mit Benzoesäure von 5,07 pkat/mg Protein auf ca. 1,5 pkat/mg Protein ab. Parallel zur Salizylsäure stiegen im mutierten Protein auch die Enzymaktivitäten mit 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 2,4-Dihydroxybenzoesäure an (Feike, 2007). In einem anderen Versuch wurde das Met-156 der D.w.SAMT von *D. wrightii* gegen ein Histidin ausgetauscht. Durch GC-MS Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das mutierte Protein nur etwa 2-mal mehr Methylsalizylat als Methylbenzoat synthetisierte, wohingegen beim Wildtyp Enzym etwa 14-mal mehr MSA als MBA gebildet wurde. Zudem nahm die Gesamtmenge an gebildetem MSA durch das mutierten Protein ab (Barkman et al., 2007).

Diese Untersuchungen belegen zweifelsfrei die Bedeutung des Methionins für die effiziente Umsetzung der Salizylsäure durch die SAMTs. Es ist aber zu vermuten, dass es nicht die alleinige ausschlaggebende Komponente ist, die den SAMT-Typ von dem BAMT-Typ unterscheidet. Dafür spricht, dass die aktiven Zentren aller SAMTs hoch konserviert sind (Tab. 3.4). Bisher wurde lediglich der Austausch eines Isoleucins (Position 225 der C.b.SAMT) gegen ein Valin bei der H.c.SAMT von *H. carnosus* festgestellt (Pott et al., 2004; Effmert et al., 2005). Die S.f.SAMT aus *S. floribunda* stellt innerhalb der SAMTs mit insgesamt vier Austauschen eine Ausnahme dar. Interessanterweise zeigt sie im Vergleich zu

den restlichen SAMTs eine sehr geringe Substratspezifität, wobei jedoch Salizylsäure nach wie vor das Hauptsubstrat ist (Pott et al., 2004). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass das gesamte aktive Zentrum der SAMTs gleichermaßen für die Bevorzugung der Salizylsäure gegenüber der Benzoesäure von Bedeutung ist. Es ist zu vermuten, dass nur ein geringer Spielraum für den Austausch einzelner Aminosäuren besteht, ohne dadurch größere Veränderungen in der Enzymaktivität mit Salizylsäure als Substrat, oder der gesamten Substratspezifität zu erhalten. Diese Vermutung kann durch Mutationsuntersuchungen an der C.b.SAMT von *C. breweri* unterstützt werden, bei der bereits der Austausch des Thyrosins an Position 147 gegen das ebenfalls polare Serin ausreichte, um die Enzymaktivität mit Salizylsäure von 1368 pmol Produkt pro Sekunde und mg Enzym, auf 240 pmol Produkt pro Sekunde und mg Enzym, zu verringern (Zubieta et al., 2003). Die nachfolgende Mutation von Met-150 zu Histidin hatte eine weitere Verringerung der Enzymaktivität bei einer nur leichten Erhöhung der Enzymaktivität mit Benzoesäure zu Folge. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass es sich bei den SAMTs um Enzyme handelt, die bereits im hohen Maße auf die Nutzung von Salizylsäure spezialisiert sind und nur noch geringe Möglichkeiten für Verbesserungen ihrer aktiven Zentren zeigen.

Im Gegensatz zu den Enzymen des SAMT-Typs weisen die aktiven Zentren der Enzyme des BAMT-Typs einen geringeren Grad an Konservierung auf (Tab. 3.4). Aus der Kenntnis der Kristallstruktur der C.b.SAMT von *C. breweri* lassen sich Gründe für die Bevorzugung der Salizylsäure gegenüber der Benzoesäure als Substrat ableiten. Es ist jedoch schwierig, in ihr nach Gründen für die Bevorzugung der Benzoesäure gegenüber der Salizylsäure als Substrat, bei den Enzymen der BAMT-Typen zu suchen. Der Grund dafür liegt darin, dass das bloße Weglassen aller für die Bevorzugung der Salizylsäure wichtigen Eigenschaften nicht zwangsläufig zu einer besseren Nutzung der Benzoesäure als Substrat führen muss. So wird das Histidin, welches in den SAMT-Typen durch ein Methionin ersetzt ist, wie bereits erwähnt, auch in Carboxyl-Methyltransferasen gefunden, die nicht Benzoesäure als bevorzugtes Substrat besitzen. Es wird vermutet, dass in den Enzymen der BAMT-Typen die aktive Tasche größer ist, wodurch die beweglichere Benzoesäure besser gebunden und umgesetzt werden kann (Effmert et al., 2005; Barkman et al., 2007). Das erklärt jedoch nicht, weshalb die Salizylsäure im Vergleich zur Benzoesäure benachteiligt ist. Es ist zu vermuten, dass für die bevorzugte Nutzung der Benzoesäure als Substrat noch weitere, bzw. andere Bindestellen im aktiven Zentrum der Enzyme des BAMT-Typs entscheidend sind. Diese Behauptung kann durch erste Untersuchungen der N.gos.NAMT1-1 aus *N. gossei* untermauert werden. Die N.gos.NAMT1-1 weist zu der N.sua.BSMT1-1 auf Proteinebene lediglich 13

Aminosäure-Austausche auf (nicht gezeigt). Trotz dieser hohen Ähnlichkeit synthetisiert sie hauptsächlich Methylnikotinat und in einem geringeren Umfang Methylsalizylat. Methylbenzoat wurde im Vergleich zu Methylnikotinat nur mit einer relativen Enzymaktivität von 0,9 % synthetisiert. Unter Zugrundelegung der Kristallstruktur der C.b.SAMT von *C. breweri* wurden veränderte Aminosäuren des aktiven Zentrums der N.gos.NAMT1-1 ausgetauscht. Der Austausch eines Thyrosins an Position 307 der N.gos.NAMT1-1 zu einem Phenylalanin führte zu einem fast 100 %igen Abfall der Methylnikotinatsynthese, wobei jedoch die Methylbenzoatbildung kaum beeinflusst wurde (nicht gezeigt). Diese ersten Untersuchungen lassen vermuten, dass es bei den Enzymen des BAMT-Typs weitere, für die Benzoessäure-Bindung wichtige Aminosäuren geben muss, und dass diese sich von den bereits bekannten, für die Umsetzung der Salizylsäure durch die C.b.SAMT wichtigen Aminosäuren, unterscheiden. Um die Frage nach den Gründen für die bevorzugte Nutzung der Benzoessäure gegenüber der Salizylsäure bei den BAMT-Typen abschließend klären zu können, wäre es auch hier notwendig, einen Vertreter dieses Typs zu kristallisieren, um die genauen Wechselwirkungen der Benzoessäure mit dem Enzym zu bestimmen.

4.3 Expression und mögliche Funktion der SAMTs und BSMTs in den untersuchten *Nicotiana*-Arten

Bereits zu Beginn dieser Arbeit war die Emission von Methylbenzoat bzw. Methylsalizylat durch die hier verwendeten *Nicotiana*-Arten von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden (Loughrin et al., 1990a; Loughrin et al., 1990b; Loughrin et al., 1991; Loughrin et al., 1993; Raguso et al., 2003a; Raguso et al., 2006). Es wurde somit vorausgesetzt, dass *N. alata*, *N. sylvestris* und *N. suaveolens* Enzyme besitzen müssen, die entsprechende Verbindungen synthetisieren können. Zudem wurde vermutet, dass diese Enzyme hohe Ähnlichkeit mit denen, zum damaligen Zeitpunkt bereits isolierten Benzoessäure- und Salizylsäure-Carboxyl-Methyltransferasen besitzen könnten. Wie bereits mehrfach ausführlich beschrieben, finden sich Methylsalizylat und Methylbenzoat häufig im Blütenduft und besitzen somit Bedeutung für die Anlockung potentieller Bestäuber (Raguso et al., 1996; Raguso und Light, 1998; Effmert et al., 2005; Knudsen et al., 2006). Methylsalizylat wird zudem noch eine wichtige Funktion in der Pathogenabwehr zugesprochen (Malamy et al., 1990; Yalpani et al., 1991; Shulaev et al., 1995; Shulaev et al., 1997; Seskar et al., 1998; Delaney, 2004). Die Expression von blütenspezifischen Benzoessäure- und Salizylsäure-Carboxyl-Methyltransferasen wurde bereits an verschiedenen Pflanzen ausführlich untersucht (Kolossova et al., 2001b; Pott et al.,

2002; Pott et al., 2004). Über die Expression von in der Pathogenabwehr bedeutsamen Carboxyl-Methyltransferasen ist *bis dato* noch relativ wenig bekannt (Fukami et al., 2002; Chen et al., 2003; Xu et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diesbezüglich erste Expressionsuntersuchungen bei den aus *N. sylvestris* und *N. alata* isolierten SAMTs und BSMTs durchgeführt. Da Untersuchungen mittels Northern-Blot-Analyse nicht zum gewünschten Erfolg führten (nicht gezeigt), wurden die synthetisierten Transkripte durch RT-PCR nachgewiesen. Der Vorteil der RT-PCR liegt vor allem in der hohen Sensitivität (Dean et al., 2002). Ein gewisser Nachteil dieser Methode liegt darin, dass durch die Vervielfältigung der vorhandenen Transkripte die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen, zueinander unabhängigen Proben erschwert wird. Die Vergleichbarkeit sollte erreicht werden, indem immer möglichst gleiche Mengen an RNA für jede Reaktion eingesetzt wurden. Die Überprüfung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch und unter Nutzung eines externen Standards durch RT-PCR. Zudem wurden die Anzahl der einzelnen Pipettierschritte minimiert und mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung des PCR-Ansatzes durch Verwendung des *Taq* PCR Master Mixes der Firma Qiagen umgangen.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die BSMTs aus *N. alata* und *N. sylvestris* in allen untersuchten Geweben, außer den Wurzeln, exprimiert wurden. Ein ähnliches Expressionsmuster konnte *bis dato* nur bei der A.t.BSMT1 aus *A. thaliana* nachgewiesen werden (Chen et al., 2003). Dieses Enzym zeigte die höchste Expression in Blüten. Im Vergleich dazu betrug die relative Transkriptmenge in Blättern und im Sproß etwa 20 % - 30 %. In Wurzeln wurde nur eine sehr geringe Expression der A.t.BSMT1 nachgewiesen. Dahingegen wurde die N.ala.BSMT2-1 in allen Organen, außer den Wurzeln, in etwa gleichem Umfang nachgewiesen. Bei *N. sylvestris* war die N.syl.BSMT2-1 Transkriptmenge in Blätter gegenüber den Blüten deutlich erhöht. Wie in *N. alata* konnten auch in *N. sylvestris* keine BSMT2-Transkripte in Wurzeln nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den Expressionsuntersuchungen an unbehandelten Pflanzen wurde die Auswirkung von Salizylsäure und Benzoesäure auf die Transkription der BSMTs in Blattstücken untersucht. Es zeigte sich, dass bei *N. alata* bereits durch die Verletzung der Blätter und deren Inkubation in Wasser die BSMT-Transkriptmenge verringert wurde, während sie bei *N. sylvestris* in etwa unverändert blieb. Dies steht im Gegensatz zu der A.t.BSMT1, deren Expression durch Verletzungen der Blätter erhöht wurde. Allerdings sind die verletzten Blätter bei *A. thaliana* an der Pflanze verblieben und nicht in Wasser inkubiert worden (Chen et al., 2003). Somit ist es fraglich, ob eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Ergebnissen gewährleistet ist. Durch die Salizylsäure- und

Benzoessäure-Behandlung der Blattstücke konnte keine Erhöhung der BSMT2-Transkription in *N. sylvestris* beobachtet werden. Es schien vielmehr zu einer leichten Abnahme der Transkriptmenge zu kommen. Bei *N. alata* kam es dahingegen wieder zu einer geringen Erhöhung der Transkriptmenge gegenüber der Wasserkontrolle. Sie lag jedoch immer noch weit unter der Ausgangskonzentration der unbehandelten Pflanze. Die hier erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass Salizylsäure und Benzoessäure keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Expression der BSMT2s aus *N. alata* und *N. sylvestris* besitzen. Dies wäre analog zu den mit *A. thaliana* erhaltenen Ergebnissen. Auch hier führte die Salizylsäure zu keiner Induktion der A.t.BSMT1 (Chen et al., 2003).

Die N.ala.SAMT1 und die N.syl.SAMT1 zeigten deutlich andere Expressionsmuster als die entsprechenden BSMTs. Während die N.syl.SAMT1 nur in Wurzeln exprimiert wurde, konnte die N.ala.SAMT1 in allen Organen und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Zudem scheint die nachgewiesene Transkriptmenge der N.ala.SAMT1 zeitlichen Schwankungen zu unterliegen. Die N.ala.SAMT1 Transkriptmenge war um Mitternacht am geringsten und um 12.00 Uhr am höchsten. Interessanterweise konnte für *N. alata* gezeigt werden, dass am Tag mehr Methylsalizylat und Methylbenzoat emittiert wird als nachts (Raguso et al., 2003a). Die periodischen Schwankungen in der Transkriptmenge lassen vermuten, dass die Transkription der N.ala.SAMT1 circadian reguliert sein könnte. Circadiane Regulationen wurden bisher nur für blütenspezifische Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen beschrieben, jedoch scheinen sie gerade dort sehr verbreitet zu sein (Kolossova et al., 2001b; Pott et al., 2002; Pott et al., 2004). Für in der Pathogenabwehr involvierte SAMTs wurde bisher nur die Induzierbarkeit durch Salizylsäure beschrieben (Métraux et al., 1990; Fukami et al., 2002; Martins et al., 2005). Allerdings wäre eine circadiane Regulation der SAMTs durchaus sinnvoll. Bei *N. alata* handelt es sich um eine nocturnal emittierende Pflanze, die vermutlich von nachtaktiven Motten bestäubt wird (Ganz, 2005). Es ist denkbar, dass am Tag durch eine erhöhte Methylsalizylatsynthese die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen verringert wird, während in der Nacht entsprechende Abwehrmechanismen wieder herunterreguliert werden.

Eine Erklärung für die alleinige geringe Expression der N.syl.SAMT1 in den Wurzeln könnte durch die erhöhte Anzahl an Mikroorganismen im Boden im Vergleich zu den oberirdischen Pflanzenorganen gesehen werden. Die Wurzel ist möglicherweise im stärkeren Maße Pathogenen ausgesetzt als die restliche Pflanze. Da ein Pathogenbefall auch häufig mit einer Erhöhung der Salizylsäurekonzentration einhergeht und diese wiederum zu einer Induktion der SAMTs führt, ist die nachgewiesene Expression der SAMT in den Wurzeln von

N. sylvestris nicht verwunderlich. Ob diese Theorie der Wahrheit entspricht könnte überprüft werden, indem *N. sylvestris* unter sterilen Bedingungen aufgezogen wird. In diesem Fall dürfte unter Normalbedingungen keine N.syl.SAMT1 Expression in Wurzeln nachweisbar sein. Eine mögliche Unterstützung dieser Theorie findet sich in der Untersuchung von steril angezogenen Wurzelkulturen aus *A. belladonna* (Fukami et al., 2002). In diesen Kulturen konnte unter standardisierten Wachstumsbedingungen keine SAMT-Expression nachgewiesen werden. Es war jedoch möglich, die A.b.SAMT Expression durch Zugabe von Salizylsäure zu induzieren. Ebenso wie die A.b.SAMT aus *A. belladonna* war auch die Expression der SAMTs aus *N. sylvestris* und *N. alata* durch Salizylsäure induzierbar. Mit Benzoesäure konnte kein eindeutiger Effekt nachgewiesen werden. Eine Erklärung für die vermutlich leichte Erhöhung der Expression könnte sein, dass die Benzoesäure als Vorstufe für die Synthese der Salizylsäure diene und diese anschließend sekundär die SAMT-Expression induziert hat. Die unterschiedlichen Expressionsmuster und Induzierbarkeiten der *Nicotiana*-SAMTs und -BSMTs, sowie die unterschiedlichen Substratspektren der entsprechenden Proteine lassen vermuten, dass sie unterschiedliche Funktionen in den Pflanzen besitzen.

Für die isolierten SAMTs kann eine direkte Funktion in der Pathogenabwehr von Tabak vermutet werden. Durch eine Vielzahl von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in *N. tabacum* nach Pathogenbefall häufig Methylsalizylat gebildet wird (Shulaev et al., 1997; Sesar et al., 1998). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Vorbehandlung von *N. tabacum* mit Methylsalizylat zu der Induktion von PR-Proteinen und einer geringeren Anfälligkeit gegenüber Pathogenen führte (Ryals et al., 1994). Weiterhin konnte aus *N. tabacum* ein Salizylsäurebindendes Protein (SABP2) isoliert werden, welches sich als Methylsalizylat-Esterase herausstellte. Durch verschiedene Untersuchungen wurde gezeigt, dass *N. tabacum*, der nicht in der Lage war das SABP2 zu exprimieren, keine SAR induzieren konnte (Kumar und Klessig, 2003; Park et al., 2007). All diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Methylsalizylat das mobile Signal darstellt, welches nach Pathogenbefall vom infizierten zum nicht infizierten Gewebe transportiert wird und dort durch Umwandlung zu Salizylsäure zur Induzierung der SAR führt.

Es soll jedoch erwähnt werden, dass *bis dato* noch kein direkter Beweis vorliegt, dass es sich bei den Methylsalizylat bildenden Enzymen in *N. tabacum* tatsächlich und ausschließlich um SAMTs handelt. Es wäre denkbar, dass SAMTs und BSMTs zusammen für die Synthese von Methylsalizylat in infiziertem Tabak verantwortlich gemacht werden könnten. Park et al. (2007) konnte zeigen, dass das „Ausschalten“ der N.t.SAMT1 in TMV befallenen *N. tabacum* Pflanzen zu einer Inhibierung der SAR-Antwort führte. Dieses Enzym lässt sich nicht, wie der

Name andeutet, den SAMT-Typen zuzuordnen, sondern es gehört zu den BAMT-Typen. Es weist eine 80 %ige Identität zu der N.sua.BSMT1-1 auf, weshalb es speziell dem BSMT-Typ-1 zugerechnet werden kann. Somit ist zu vermuten, dass es eine erhöhte Präferenz für Benzoesäure und nicht für Salizylsäure als Substrat besitzt. Neben der N.t.SAMT1 wurde bereits die Expression einer SAMT aus *N. tabacum* (N.tab.SAMT1) nachgewiesen (Martins und Barkman, 2005). Weiterhin konnte in *N. tabacum* ebenfalls die Expression eines Enzyms mit hoher Ähnlichkeit zu den Enzymen des BSMT-Typ-2 gezeigt werden (N.tab.BSMT2-1; Barkman, persönliche Information). Diese Untersuchungen zeigen, dass neben der N.t.SAMT1 (Park et al., 2007) noch zwei weitere Enzyme in *N. tabacum* (N.tab.BSMT2-1 und N.tab.SAMT1) exprimiert werden, welche vermutlich in der Lage sind, Methylsalizylat zu synthetisieren. Für die isolierte N.tab.SAMT1 wurde bereits eine Aktivität mit Salizylsäure nachgewiesen (Martins und Barkman, 2005). Somit ist es erstaunlich, dass das alleinige „Ausschalten“ der N.t.SAMT1 zu einer Inhibierung der SAR-Antwort führte. Es wäre jedoch denkbar, dass aufgrund der hohen Identität dieser drei Enzyme zueinander nicht nur die N.t.SAMT1, sondern auch die potentielle N.tab.BSMT2-1 und die von Martins und Barkman isolierte N.tab.SAMT1 „ausgeschaltet“ wurden. Dies würde bedeuten, dass es nach wie vor ungeklärt ist, ob die SAMTs allein für die Synthese des Methylsalizylats als mobiles Signal verantwortlich sind oder ob die BSMTs auch dazu beitragen. Gegen das Zusammenwirken der SAMTs und BSMTs spricht vor allem deren unterschiedliche Expression und Induzierbarkeit.

Untersuchungen der Promotoraktivität der A.t.BSMT1 aus *A. thaliana* zeigten, dass sie an der Basis von Trichomen und in Hydatoden exprimiert wird. Durch den Befall der Blätter durch Trips der Gattung *Frankliniella* wurde eine starke Promotoraktivität direkt an den Läsionen nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass die A.t.BSMT1 somit möglicherweise eine Funktion in der direkten Abwehr von Pathogenen besitzen könnte (Chen et al., 2003). Bereits in früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Methylsalizylat und Methylbenzoat nach deren Aufnahme durch Insekten auf diese toxisch wirkten (Lindberg et al., 2000; Chen et al., 2003). Eine vergleichbare Funktion wäre auch bei den aus verschiedenen *Nicotiana*-Arten isolierten BSMTs denkbar. Die Expression an der Basis von Trichomen und in Hydatoden würde zudem eine Erklärung für die fehlende Expression in den Wurzeln darstellen. Allerdings konnte durch Horiuchi et al. (2007) gezeigt werden, dass Methylbenzoat einen inhibierenden Einfluss auf das Wurzelwachstum von *A. thaliana* besitzt. Falls das auch bei den untersuchten *Nicotiana*-Arten der Fall ist, könnte es ebenfalls die Erklärung für die fehlende BSMT-Expression darstellen.

Ein wichtiger Punkt für die Vorhersage der Funktion der *Nicotiana*-SAMTs und -BSMTs ist die Kenntnis über die zur Verfügung stehenden Substrate. Alle untersuchten Enzyme zeigten Aktivität mit Salizylsäure und mit Benzoesäure als Substrat, wobei jedoch die relativen Aktivitäten zueinander stark variierten. Welche Reaktion die Enzyme *in planta* tatsächlich katalysieren, hängt im großen Maße vom vorhandenen Substrat ab. Dies konnte bereits für die S.f.SAMT gezeigt werden, die trotz eines kleineren K_m -Wertes und einer höheren katalytischen Aktivität für Salizylsäure aufgrund des ca. 2000-fachen Überschusses an Benzoesäure in Blüten, vorwiegend Methylbenzoat synthetisiert (Pott et al., 2004).

Es ist nach wie vor unklar, wie genau die Synthesewege für Salizylsäure und Benzoesäure bei *Nicotiana spec.* aussehen. Für Salizylsäure wurden sowohl Benzoesäure abhängige, wie Benzoesäure unabhängige Wege vermutet und zum Teil beschrieben (Boatright et al., 2004; Wildermuth et al., 2001). Ein Zusammenwirken der SAMTs und BSMTs im Rahmen der Synthese von Methylsalizylat wäre über einen Benzoesäure unabhängigen Weg sinnvoll, da ansonsten die gebildete Benzoesäure zum Teil bereits durch die BSMTs zu Methylbenzoat umgesetzt werden könnte. Es wäre jedoch auch denkbar, dass die für die Synthese von Salizylsäure verantwortliche Benzoesäure-2-Hydroxylase eine bedeutend höhere katalytische Aktivität und einen geringeren K_m -Wert mit Benzoesäure aufweist als die BSMTs. Dies würde einen Benzoesäure abhängigen Weg für die Synthese der Salizylsäure und ein gleichzeitiges Zusammenwirken der *Nicotiana*-SAMTs und -BSMTs ermöglichen.

Neben dem Zusammenwirken von BSMTs und SAMTs bei der Synthese von Methylsalizylat wäre auch eine regulatorische Funktion der BSMTs denkbar. Dies würde jedoch die Synthese der Salizylsäure aus Benzoesäure voraussetzen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression der Benzoesäure-2-Hydroxylase in *N. tabacum* durch Benzoesäure induziert wird (León et al., 1993). Weiterhin wird die Expression der in die Pathogenabwehr involvierten SAMTs durch Salizylsäure induziert (Fukami et al., 2002; Martins et al., 2005). Folglich ist es von großer Bedeutung, die gebildete Benzoesäurekonzentration zu kontrollieren. Es ist möglich, dass die BSMTs dazu dienen, dass in gesunden Pflanzen ein gewisser Benzoesäurelevel nicht überschritten wird, indem sie überschüssige Benzoesäure zu Methylbenzoat umsetzen. Kommt es durch einen Pathogenbefall zu einem starken Anstieg der freien Benzoesäurekonzentration, würde dadurch die Expression der Benzoesäure-2-Hydroxylase aktiviert und Salizylsäure synthetisiert.

Durch den Pathogenbefall der Pflanzen könnten die BSMTs entweder herunterreguliert werden oder sie könnten zusätzlich mit den SAMTs die Synthese von Methylsalizylat unterstützen. Das würde wiederum voraussetzen, dass die Benzoesäure-2-Hydroxylase eine

höhere katalytische Aktivität mit Benzoessäure besitzt als die BSMTs und die neu synthetisierte Benzoessäure fast vollständig zu Salizylsäure umgesetzt wird.

Um die Funktion der SAMTs und BSMTs in den verschiedenen *Nicotiana*-Arten klären zu können wäre es sinnvoll, die einzelnen Gene gezielt „auszuschalten“. Auch Untersuchungen, die die Orte der Expression der Gene bzw. die Lokalisation der Proteine aufklären, wären für die Lösung dieser Fragen denkbar.

4.4 SAMTs, BSMTs und der Blütenduft der Solanaceen

Innerhalb der Solanaceen finden sich viele Arten, die in ihrem Blütenduft Methylsalizylat, Methylbenzoat oder beide Verbindungen gemeinsam emittieren (Negre et al., 2003; Raguso et al., 2003a; Raguso et al., 2003b; Raguso et al., 2006; Martins et al., 2007). Bis vor kurzem war nur wenig über den Ursprung der entsprechenden Gene bekannt. Aus Blüten von *N. suaveolens*, *D. wrightii*, *C. nocturnum* und *P. hybrida* konnten mittlerweile die für die Synthese von Methylbenzoat und Methylsalizylat verantwortlichen Enzyme isoliert werden. Während sich die Enzyme aus *D. wrightii*, *C. nocturnum* und *P. hybrida* den SAMT-Typ zuordnen lassen, gehört die N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* zu dem BSMT-Typ. Die Fähigkeit für die Synthese von Methylsalizylat und Methylbenzoat lässt sich innerhalb der Solanaceen somit auf das Vorhandensein zueinander orthologer und paraloger Enzyme zurückführen (Martins et al., 2007). Durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse kann gezeigt werden, dass der Ursprung der blütenspezifischen SAMTs aus *D. wrightii*, *C. nocturnum* und *P. hybrida* direkt bei den in die Pathogenabwehr involvierten SAMTs liegt, während sich die N.sua.BSMT1-1 aus Enzymen des BSMT-Typ-1 entwickelt hat. Innerhalb der Gattung *Nicotiana* wurden ebenfalls Methylbenzoat bzw. Methylsalizylat emittierende Arten identifiziert. Während die australischen Arten *N. suaveolens* und *N. cavicola* größere Mengen an Methylsalizylat und Methylbenzoat im Blütenduft emittieren, konnten diese Verbindungen in den südamerikanischen Arten nicht oder nur in sehr geringen Mengen detektiert werden (Raguso et al., 2003a; Raguso et al., 2006). Die durch Raguso et al. (2003a) nachgewiesene Emission von geringen Mengen an Methylbenzoat und Methylsalizylat in *N. alata* und von Methylbenzoat in *N. sylvestris* konnten durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GC-MS Messungen des Blütendufte von *N. alata* und *N. sylvestris* nicht bestätigt werden (siehe 6.4.2). Trotzdem stellen diese Ergebnisse keinen direkten Widerspruch dar, sondern sie unterstreichen vielmehr die sehr geringe Emission dieser Verbindungen in *N. alata* und *N. sylvestris*. Die Emission von Methylbenzoat und

Methylsalizylat steht zudem in Einklang mit der Expression und Substratspezifität der aus *N. alata* und *N. sylvestris* isolierten SAMTs und BSMTs. Während in *N. alata* die Expression der N.ala.BSMT2-1 und der N.ala.SAMT1 sowohl in Blüten wie auch in Blättern nachgewiesen werden konnte, war in den jeweiligen Organen in *N. sylvestris* nur die N.syl.BSMT2-1 Expression nachweisbar. Das entsprechende Enzym zeigte eine hohe Spezifität für Benzoesäure. Salizylsäure wurde von der N.syl.BSMT2-1 nur in sehr geringem Umfang methyliert. Somit ist es nicht verwunderlich, dass bei *N. sylvestris* lediglich die Emission von Methylbenzoat nachgewiesen werden konnte. Die N.ala.SAMT1 und die N.ala.BSMT2-1 waren beide in der Lage Methylsalizylat und Methylbenzoat zu synthetisieren, wodurch sich die Emission beider Verbindungen in *N. alata* erklären lässt. Zusätzlich zu der N.ala.BSMT2-1 konnte noch die Expression eines als N.ala.BSMT3-1 bezeichneten Gens nachgewiesen werden, welches vermutlich ebenfalls an der Synthese von Methylbenzoat und Methylsalizylat beteiligt sein könnte. In *N. sylvestris* wurden neben der in Wurzeln exprimierten N.syl.SAMT1 und der N.syl.BSMT2-1 bisher keine weiteren BSMT- oder SAMT-Sequenzen identifiziert. Diese Ergebnisse sind ein starkes Indiz dafür, dass sich die von Raguso et al. (2003a) gemessenen Emissionen auf die hier isolierten Enzyme zurückführen lassen und nicht wie in *N. suaveolens* auf eine blütenspezifische BSMT.

In *N. suaveolens* konnte neben der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 noch eine SAMT (N.sua.SAMT1) und zwei BSMTs (N.sua.BSMT2 und N.sua.BSMT3-1) identifiziert werden. Expressionsuntersuchungen, die derzeit von Anja Zeissler im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt werden zeigen, dass auch hier die N.sua.SAMT1 nur in Wurzeln exprimiert wird, während sich die N.sua.BSMT2-1 und die *bis dato* noch nicht charakterisierte N.sua.BSMT3-1 in Blüten und Blättern aber nicht, bzw. nur in sehr geringem Umfang, in Wurzeln nachweisen lassen (Zeissler, unveröffentlicht). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass an der Synthese von Methylsalizylat und Methylbenzoat in Blüten von *N. suaveolens* alle drei isolierten BSMTs beteiligt sein sollten. Es ist jedoch zu vermuten, dass der Hauptanteil der Synthese von der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 durchgeführt wird, da deren Abundanz die der N.sua.BSMT2-1 und N.sua.BSMT3-1 um ein vielfaches übersteigt. Weiterhin ist zu vermuten, dass die im Blütenduft von *N. suaveolens* nachgewiesenen Verbindungen Methylantranilat, Methylnikotinat und Methylzimtsäure auch durch die hier nachgewiesenen BSMTs synthetisiert werden können und somit wahrscheinlich nicht auf die Syntheseleistungen anderer Enzyme zurückzuführen sind. Der Grund für diese Annahme liegt vor allem in der nachgewiesenen Substratspezifität der N.sua.BSMT1-1, welche alle diese Verbindungen synthetisieren kann (Pott et al., 2004).

Die australische Art *N. gossei* emittiert im Blütenduft vor allem Methylnikotinat und Methylsalizylat. Durch die Arbeitsgruppe von Todd Barkman (Western Michigan University) konnte aus Blüten ein Enzym isoliert werden, das sich auf Aminosäureebene durch 13 Aminosäure-Austausche von der N.sua.BSMT1-1 unterscheidet (unveröffentlicht). Durch Untersuchungen der Substratspezifität dieses Enzyms stellte sich heraus, dass es im Gegensatz zu der N.sua.BSMT1-1 sehr spezifisch für Nikotinsäure ist.

Über die Verwandtschaft und die Entstehung der N.sua.BSMT1-1 und der N.gos.NAMT1-1 kann nur spekuliert werden. Wie bereits beschrieben, besitzt die N.gos.NAMT1-1 höhere Ähnlichkeit zu den *N. suaveolens*-Fragmenten 6 und 8 als zu der N.sua.BSMT1-1. Es wäre denkbar, dass eine Sequenz durch Duplikation aus der anderen hervorgegangen ist. Während die eine Art nun noch das Original exprimiert, würde in der anderen Art das Duplikat abgelesen und ein leicht verändertes Enzym mit einer anderen Substratspezifität gebildet.

Die Entstehung der blütenspezifischen Enzyme der Sektion *Suaveolentes* könnte auf einer Duplikation eines bereits vorhandenen Enzyms des BSMT-Typ-1 beruhen. Als potentieller Kandidat wäre die N.sua.BSMT3-1 Sequenz vorstellbar. Da die vollständige Sequenz dieses Gens bisher noch unbekannt ist, konnte es weder dem BSMT-Typ-1 noch dem BSMT-Typ-2 direkt zugerechnet werden, weshalb diese Sequenz vorerst dem neuen BSMT-Typ-3 zugeordnet wurde. Es ist jedoch denkbar, dass die Aufklärung der vollständigen codierenden Sequenz dieses Gens möglicherweise deren Zuordnung zum BSMT-Typ-1 erlaubt. Dies würde auch erklären, dass in *N. alata* und *N. sylvestris* bisher kein weiteres zum BSMT-Typ-1 gehörendes Enzym isoliert werden konnte. Als weitere Erklärung wäre denkbar, dass die Vorfahren der heutigen N.sua.BSMT1-1 und der N.sua.BSMT3-1 durch Hybridisierung zusammengekommen sind und sich die N.sua.BSMT1-1 durch Veränderungen im Expressionsmuster zu einem blütenspezifischen Enzym entwickelt hat. Dies würde bedeuten, dass in nahe verwandten Arten von *N. suaveolens*, die keine Emission von Methylbenzoat und Methylsalizylat zeigen, trotzdem beide Gene zu finden sein müssten. Um diese Fragen zu klären wäre es notwendig, weitere auch nicht Methylbenzoat und Methylsalizylat emittierende Vertreter der Sektion *Suaveolentes* auf das Vorhandensein dieser Gene hin zu untersuchen.

5. Literaturverzeichnis

Andersen, R.A., Hamilton-Kemp, T.R., Loughrin, J.H., Hughes, C.G., Hildebrandt, D.F., Sutton, T.G. (1988). Green leaf volatiles from *Nicotiana tabacum* lines of different trichome morphology. *J. Agric. Food Chem.* 36: 295-299.

Aoki, S., Ito, M. (2000). Molecular phylogeny of *Nicotiana* (Solanaceae) based on the nucleotide sequence of the *matK* gene. *Plant biology* 2: 316-324.

Avdiushko, S., Croft, K.P.C., Brown, G.C., Jackson, D.M., Hamilton-Kemp, T.R., Hildebrand, D. (1995). Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylipin pathway in Tobacco, Cucumber, and Arabidopsis. *Plant Physiology* 109: 1227-1230.

Baldwin, I.T., Hamilton, W. (2000). Jasmonate-induced responses of *Nicotiana sylvestris* results in fitness costs due to impaired competitive ability for nitrogen. *Journal of Chemical Ecology* 26 (4): 915- 952.

Barkman, T., Martins, T., Sutton, E., Stout, J. (2007). Positive selection for a single amino acid change promotes substrate discrimination of a plant volatile-producing enzyme. *Molecular Biology and Evolution* 24 (6): 1320-1329.

Bennet, J.W., Bentley, R. (1989). What's in a name? Microbial secondary metabolism. *Adv. Appl. Microbiol.* 34: 1-28.

Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C.M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D., Dudareva, N. (2004). Understanding in vivo benzenoid metabolism in *Petunia* petal tissue. *Plant Physiology* 135: 1993-2011.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987). X11-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Bio Techniques* 5: 376-379.

Buttery, R.G., Ling, L.C., Wellso, S.G. (1982a). Oat leaf volatiles – possible insect attractants. *J. Agric. Food Chem.* 30: 791-792.

Buttery, R.G., Kamm, J.A., Ling, L.C. (1982b). Volatile components of alfalfa flowers and pods. *J. Agric. Food Chem.* 30: 739-742.

Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., van Montagu, M., Inze, D., van Camp, W. (1996). Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develop necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J.* 10: 491-503.

Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Reporter* 11: 113-116.

Chase, M.W., Knapp, S., Cox, A.V., Clarkson, J.J., Butsko, Y., Joseph, J., Savolainen, V., Parkonny, A.S. (2003). Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany* 92: 107-127.

Chen, F., D'Auria, J.C., Tholl, D., Ross, J.R., Gershenzon, J., Noel, J.P., Pichersky, E. (2003). An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J.* 36: 577-588.

Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.

Chester K.S. (1933). The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quart. Rev. Biol.* 8: 275-324.

Chong, J., Pierrel, M.-A., Atanassova, R., Werck-Reichhart, D., Fritig, B., Saindrenan, P. (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiology* 125: 318-328.

- Conrath, U., Silva, H., Klessig, D.F.** (1997). Protein dephosphorylation mediates salicylic acid-induced expression of *PR-1* genes in tobacco. *Plant Journal* 11: 747-754.
- Dahl, C.C., Baldwin, I.T.** (2004). Methyl jasmonate and cis-jasmone do not dispose of the herbivore-induced jasmonate burst in *Nicotiana attenuata*. *Physiologia Plantarum* 120 (3): 474-481.
- Dangl, J.** (1998). Plants just say NO to pathogens. *Nature* 394: 525-527.
- D'Auria, J.C., Chen, F., Pichersky, E.** (2003). The SABATH family of MTs in *Arabidopsis thaliana* and other plant species. *Rec.Adv. Phytochem.* 37: 95-125.
- Dean, J.D., Goodwin, P.H., Hsiang, T.** (2002). Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of β -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 347-356.
- Delaney, T.P.** (2004). Salicylic acid. *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action.* Edited by P.J. Davies. Kluwer Academic Publishers: 635-653.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J.** (1994). A centrale role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F.** (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18 (4): 547-575.
- Dudareva, N., Picchulla, B., Pichersky, E.** (2000). Biogenesis of floral scent. *Horticultural Reviews* 24: 32-54.
- Durner, J., Klessig, D.F.** (1996). Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.* 271: 28492-28501.

Durner, J., Klessig, D.F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11312-11316.

Effmert, U., Saschenbrecker, S., Ross, J., Negre, F., Fraser, C.M., Noel, J.P., Dudareva, N., Piechulla, B. (2005). Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: From in vitro to in planta function. *Phytochemistry* 66: 1211-1230.

Farmer, E.E., Johnson, R.R., Ryan, C.A. (1992). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology* 98: 995-1002.

Feike, J. (2007). Charakterisierung funktioneller Aminosäuren in der Benzoessäure/Salizylsäure:S'-Adenosyl-L-Methionin-Carboxylmethyltransferase (BSMT) von *Nicotiana suaveolens*. Diplomarbeit, Universität Rostock.

Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D., Chen, Y., Fridman, E., Park, S.W., Chiang, Y., Acton, T.B., Montelione, G.T., Pichersky, E., Klessig, D.F., Tong, L. (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *PNAS* 102 (5): 1773-1778.

Fröhlich, O., Schreier, P. (1989). Additional volatile constituents of carambola (*Averrhoa carambola* L.) fruit. *Flav. Fragr. J.* 4: 177-184.

Fukami, H., Asakura, T., Hirana, H., Abe, K., Shimomura, K., Yamakawa, T. (2002). Salicylic acid carboxyl methyltransferase induced in hairy root cultures of *Atropa belladonna* after treatment with exogeneously added salicylic acid. *Plant Cell Physiology*: 43 (9): 1054-1058.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.

Ganz, C. (2005). Duftstoffemission und Charakterisierung der Linalool-Synthase aus *Nicotiana glauca*. Dissertation, Universität Rostock.

Goodspeed, T.H. (1954). The genus *Nicotiana*. Chronica Botanica. Waltham Massachusetts.

Hamilton-Kemp, T.R., Andersen, R.A., Rodriguez, J.G., Loughrin, J.H., Patterson, C.G. (1988). Strawberry foliage headspace vapour components at periods of susceptibility and resistance to *Tetranychus urticae*. Koch. J. Chem. Ecol. 14: 789-796.

Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell 8: 1773-1791.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

Hausladen, A., Stamler, J.S. (1998). Nitric oxide in plant immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10345-10347.

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.

Heidebrecht, D. (2005). Untersuchungen zur Methylsalicylat-Emission aus *Hoya carnosa* und biochemische Charakterisierung der S-Adenosyl-L-Methionin: Salicylsäure-Carboxyl-Methyltransferase. Diplomarbeit, Universität Rostock

Hennig, J. (2002). Isolierung, Strukturanalyse und phylogenetischer Vergleich der Gene für die Salizylsäure-Methyltransferase (SAMT) aus Blüten höherer Pflanzen. Diplomarbeit, Universität Rostock.

Hermann, K. (1990). Salizylsäure und andere verbreitete Hydroxysäuren und deren natürlich vorkommende Verbindungen in Lebensmitteln. Ernährungs-Umschau 37: 108-112.

Hermann, K.M., Weaver, L.M. (1999). The shikimate pathway. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 473-503.

Hippauf, F. (2004). Überexpression und biochemische Charakterisierung der S-Adenosyl-L-Methionin: Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferase (BAMT) aus *Nicotiana suaveolens*. Diplomarbeit, Universität Rostock.

Hoballah, M.E., Stuurman, J., Turlings, T.C.J., Guerin, P.M., Connétable, S., Kuhlemeier, C. (2005). The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta* 222: 141-150.

Horiuchi, J-I., Badri, D.V., Kimball, B.A., Negre, F., Dudareva, N., Paschke, M.W., Vivanco, J.M. (2007). The floral volatile, methyl benzoate, from snapdragon (*Antirrhinum majus*) triggers phytotoxic effects in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 226: 1-10.

Ibrahim, R.K., Bruneau, A., Bantignies, B. (1998). Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Molecular Biology* 36: 1-10.

Ibrahim R.K. (1997). Plant O-methyltransferases signatures. *Trends in Plant Sci.* 2: 249-250.

Inoue, K., Sewalt, V.J., Murray, G.B., 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 Physiology* 117: 761-770.

Kapteyn, J., Qualley, A.V., Xie, Z., Fridman, E., Dudareva, N., Gang, D.R. (2007). Evolution of Cinnamate/p-Coumarate Carboxyl Methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate. *The Plant Cell* 19: 3212-3229.

Kato, M., Mizuno, K., Crozier, A., Fujimura, T., Ashihara, H. (2000). Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature* 406: 956-957.

Kato, M., Mizuno, K., Fujimura, T., Iwama, M., Irie, M., Crozier, A., Ashihara, H. (1999). Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiology* 120: 579-586.

Kawano, T., Furuichi, T., Muto, S. (2004). Controlled salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant Biotechnology* 21 (5): 319-335.

Kawano, T., Muto, S. (2000). Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *Journal of Experimental Botany* 51 (345): 685-693.

Kawano, T., Sahashi, N., Takahashi, K., Ouzumi, N., Muto, S. (1998) Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 39: 721-730.

Kessler, A., Baldwin, I.T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144.

Khanuja, S. P. S., Shasamy, A. K., Darokar, M. P., Kumar S. (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plant producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-7.

Kitamura, S., Inoue, M., Shikazono, N., Tanaka, A. (2001). Relationships among *Nicotina* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 103: 678-686.

Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defense. *PNAS* 97 (16): 8849-8855.

Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J. (2006). Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review* 72 (1): 1-120.

Knudsen, J.T., Tollsten, L., Bergström, L.G. (1993). Floral scents - a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33: 253-280.

Kolossova, N., Sherman, D., Karlson, D., Dudareva, N. (2001a). Cellular and subcellular localization of S-adenosyl-L-methionine: benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methylbenzoate in Snapdragon flowers. *Plant Physiology* 126: 956-964.

Kolossova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M., Dudareva, N. (2001b). Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *The Plant Cell* 13: 2333-2347.

Koo, Y.J., Kim, M.A., Kim, E.H., Song, J.T., Jung, C., Moon, J.K., Kim, J-H., Seo, H.S., Song, S.I., Kim, J-K., L, J.S., Cheong, J-J., Choi, Y.D. (2007). Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 64: 1-15.

Kreitsch, J. (2006). Biochemische Charakterisierung der S-Adenosyl-L-Methionin: Salizylsäure-Carboxyl-Methyltransferasen aus *Hoya carnosa*. Diplomarbeit, Universität Rostock.

Krohn, K. (2007). Überexpression und biochemische Charakterisierung der S-Adenosyl-L-Methionin:Salicylsäure-Carboxyl-Methyltransferasen (SAMTs) aus *Cestrum nocturnum* und *Datura wrightii*. Diplomarbeit, Universität Rostock.

Kumar, D., Klessig, D.F. (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *PNAS* 100 (26): 16101-16106.

Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Anu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.

Lee, H.-I., León, J., Raskin, I. (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4076-4079.

- León, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M.A., Raskin, I.** (1995). Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10413-10417.
- León, J., Yalpani, N., Raskin, I., Lawton, M.A.** (1993). Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. Plant Physiology 103: 323-328.
- Li, C., Williams, M.M., Loh, Y-T., Lee, G.I., Howe, G.A.** (2002). Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. Plant Physiology 130: 494-503.
- Lieber, C.S., Packer, L.** (2002). S-Adenosylmethionine: molecular, biological and clinical aspects – an introduction. Am. J. Clin. Nutr. 76: 1148S-1150S.
- Lindberg, C.M., Melathopoulos, A.P., Winston, M.L.** (2000). Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. J. Econ. Entomol. 93: 189-198.
- Löscher, R., Heide, L.** (1994). Biosynthesis of p-hydroxy-benzoate from p-coumarate and p-coumaroyl-coenzymeA in cell free extracts of *Lithospermum erythrorhizon* cell culture. Plant Physiology 106: 271-279.
- Lottspeich, F., Zorbas, H.** (1998). Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Loughrin, J.H., Hamilton-Kemp, T., Burton, H.R., Andersen, R.A.** (1993). Effect of diurnal sampling on the headspace composition of detached *Nicotiana suaveolens* flowers. Phytochemistry 32: 1417-1419.
- Loughrin, J.H., Hamilton-Kemp, T.R., Andersen, R.A., Hildebrand, D.F.** (1991). Circadian rhythm of volatile emission from flowers of *Nicotiana sylvestris* and *N. suaveolens*. Physiologia Plantarum 83: 492-496.
- Loughrin, J.H., Hamilton-Kemp, T.R., Andersen, R.A., Hildebrand, D.F.** (1990a). Headspace compounds from flowers of *Nicotiana tabacum* and related species. J. Agric. Food Chem. 38: 455-460.

- Loughrin, J.H., Hamilton-Kemp, T.R., Andersen, R.A., Hildebrand, D.F.** (1990b). Volatiles from flowers of *Nicotiana sylvestris*, *N. othphora* and *Malus x domestica*: Headspace components and day/night changes in their relative concentrations. *Phytochemistry* 29 (8): 2473-2477.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I.** (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.
- Martins, T.R., Stout, J.T., Todd, S.E., Kuipers, K., Barkman, T.J.** (2007). Molecular phylogenetic tests of floral scent evolution in the Solanaceae. *Acta Hort.* 745: 183-200.
- Martins, T.R., Barkman, T.J.** (2005). Reconstruction of Solanaceae phylogeny using the nuclear gene SAMT. *Systematic Botany* 30 (2): 435-447.
- Maxwell, C.A., Harrison, M.J., Dixon, R.A.** (1993). Molecular characterization and expression of alfalfa isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase, an enzyme specifically involved in the biosynthesis of an inducer of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Journal* 4: 971-981.
- 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: 158-166.
- Mazzafera, P., Wingsle, G., Olsson, O., Sandberg, G.** (1994). S-adenosyl-L-methionine: theobromine 1-N-methyltransferase, an enzyme catalyzing the synthesis of caffeine in coffee. *Phytochemistry* 37: 1577-1584.
- Meng, H., Campbell, W.H.** (1998). Substrate profiles and expression of caffeoyl coenzyme A and caffeic acid O-methyltransferases in secondary xylem of aspen during seasonal development. *Plant Molecular Biology* 38: 513-520.
- Métraux, J.P., Singer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B.** (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006.

Meuwly, P., Mölders, W., Buchala, A., Métraux, J.P. (1995). Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. *Plant Physiology* 109: 1107-1114.

Murfitt, L.M., Kolosova, N., Mann, C.J., Dudareva, N. (2000). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 382: 145-151.

Negre, F., Kish, C.M., Boatright, J., Underwood, B., Shibuya, K., Wagner, C., Clark, D.G., Dudareva, N. (2003). Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers. *The Plant Cell* 15: 2992-3006.

Negre, F., Kolosova, N., Knoll, J., Kish, C.M., Dudareva, N. (2002). Novel S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme responsible for biosynthesis of methyl salicylate and methyl benzoate, is not involved in floral scent production in snapdragon flowers. *Arch. Biochem. Biophys.* 406: 261-270.

Noel, J.P., Dixon, P.R.A., Pichersky, E., Zubieta, C., Ferrer, J.L. (2003). Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. In *Recent Adv. In Phytochemistry* 37, Oxford: Elsevier science Ltd.: 37-58.

Nugroho, L.H. und Verpoorte, R. (2002). Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 105-125.

Ogawa, M., Herai, Y., Koizumi, N., Kusana, T., Sano, H. (2001). 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants: Gene isolation and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 276: 8213-8218.

Park, S-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318 (5847): 113-116.

Parvathi, K., Chen, F., Guo, D., Blount, J.W., Dixon, R.A. (2001). Substrate preferences in O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *Plant Journal* 25: 193-202.

Pichersky, E., Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 237-243.

Piechulla, B., Pott, M.B. (2003). Plant scents – mediators of inter- and intraorganismic communication. *Planta* 217: 687-689.

Pott, M.B., Hippauf, F., Saschenbrecker, S., Chen, F., Ross, J., Kiefer, I., Slusarenko, A., Noel, J.P., Pichersky, E., Effmert, U., Piechulla, B. (2004). Biochemical and structural characterization of benzenoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens*. *Plant Physiology* 135: 1946-1955.

Pott, M. (2003). Molekulare und biochemische Regulation der Emission von Blütenduftstoffen. Dissertation, Universität Rostock. ISBN 3-89825-646-4

Pott, M.B., Pichersky, E., Piechulla, B. (2002). Evening-specific oscillations of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda*. *J. Plant Physiology* 159: 925-934.

Qin, G., Gu, H., Zhao, Y., Ma, Z., Shi, G., Yang, Y., Pichersky, E., Chen, H., Liu, M., Chen, Z., Qu, L.-J. (2005). An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. *The Plant Cell* 17: 2693-2704.

Raguso, R.A., Schlumpberger, B.O., Kaczorowski, R.L., Holtsford, T.P. (2006). Phylogenetic fragrance patterns in *Nicotiana* sections *Alatae* and *Suaveolentes*. *Phytochemistry* 67: 1931-1942.

Raguso, R.A., Levin, R.A., Foose, S.E., Holmberg, M.W., McDade, L.A. (2003a). Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* 63: 265-284.

Raguso, R.A., Henzel, C., Buchmann, S.L., Nabhan, G.P. (2003b). Trumpet flowers of sonoran desert: floral biology of *Peniocereus cacti* and sacred *Datura*. *Int. J. Plant Sci.* 164 (6): 877-892.

- Raguso, R.A., Light, D.M.** (1998). Electroantennogram responses of male *Sphinx perelegans* hawkmoths to floral and 'green-leaf volatiles'. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86: 287-293.
- Raguso, R.A., Light, D.M., Pichersky, E.** (1996). Electroantennogram responses of *Hyles lineate* (Shingidae: Lepidoptera) to volatile compounds from *Clarkia breweri* (Onagraceae) and other moth-pollinated flowers. *Journal of Chemical Ecology* 22 (10): 1735-1766.
- Rao, M., Paliyath, G., Ormrod, G., Murr, D.P., Watkins, C.B.** (1997). Influence of salicylic acid H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes: Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiology* 115: 137-149.
- Rasmussen, J., Hammerschmidt, R., Zook, M.N.** (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology* 97: 1342-1347.
- Ravanel, S., Block, M.A., Rippert, P., Jabrin, S., Curien, G., Rébeillé, F., Douce, R.** (2004). Methionine metabolism in plants. *The Journal of Biological chemistry* 279 (21): 22548-22557.
- Reed, S.M.** (1991). Cytogenic evolution and aneuploidy in *Nicotiana*. In Tschuicha, T., Gupta, R.K.: *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. Amsterdam, Elsevier: 483-505.
- Riechers, D.E., Timko, M.P.** (1999). Structure and expression of the gene family encoding putrescine *N*-methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: new clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco. *Plant Molecular Biology* 41: 387-401.
- Rohrbeck, D., Buss, D., Effmert, U., Piechulla, B.** (2006). Localization of methyl benzoate synthesis and emission in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens* flowers. *Plant Biology* 8: 615-626.
- Ross A.F.** (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* 14: 329-339.

Ross A.F. (1961b) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358.

Ross, J.R., Nam, K.H., D'Auria, J.C., Pichersky, E. (1999). S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 367: 9-16.

Ross, J.R. (2002). S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase (SAMT): an enzyme involved in floral scent and plant defence in *Clarkia breweri*. Ph.D. Thesis, University of Michigan, Ann Arbor.

Ryals, J.A. Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H-Y., Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.

Ryals, J., Uknes, S., Ward, E. (1994). Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 104: 1109-1112.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Saschenbrecker, S. (2003). Untersuchung der Expression der S-Adenosyl-L-Methionin: Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferase (BAMT) in *Nicotiana suaveolens*. Diplomarbeit, Universität Rostock.

Savenkova, M.I., Mueller, D.M., Heinecke, J.W. (1994). Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low-density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 269: 20394-20400.

Schenk, P. M., Baumann, S., Mattes, R., Steinbiß, H.-H. (1995). Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare ^{Arg}tRNAs. *BioTechniques* 19 (2): 196-200.

Schlegel, H.G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*; 7. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Schnitzler, J.-P., Madlung, J., Rose, A., Seitz, H.U. (1992). Biosynthesis of p-hydroxybenzoic acid in elicitor-treated carrot cell cultures. *Planta* 188: 594-600.

Schwab W. (2003). Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry* 62: 837-849.

Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-W., Hwang, I., Lee, J.S., Choi, Y.D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *PNAS* 98 (8): 4788-4793.

Serino, L., Reimann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P., Haas, D. (1995). Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 249 (2): 217-228.

Seskar, M., Shulaev, V., Raskin, I. (1998). Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiology* 116: 387-392.

Shoji, T., Yamada, Y., Hashimoto, T. (2000). Jasmonate induction of Putrescine N-Methyltransferase genes in the root of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiology* 41 (7): 831-839.

Shulaev, V., Silverman, P., Raskin, I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721.

Shulaev, V., León, J., Raskin, I. (1995). Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in Tobacco? *The Plant Cell* 7: 1691-1701.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.

Stuhlfelder, C., Mueller, M.J., Warzecha, H. (2004). Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *Eur. J. Biochem.* 271: 2976-2983.

Swofford, D.L. (2003). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates.

Takahashi, H., Chen, Z., Du, H., Liu, Y., Klessig, D.F. (1997). Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J.* 11: 993-1005.

Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 523-533.

Ulland, S., Ian, E., Mozuaritis, R., Borg-Karlson, A-K., Meadow, R., Mustaparta, H. (2008). Methyl salicylate, identified as primary odorant of a specific receptor neuron type, inhibits oviposition by moth *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae). *Chemical senses* 33 (1): 35-46.

Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, Y., Cortes, D., Je Ma, C., Noel, J.P., Mander, L., Shulaev, V., Kamiya, Y., Rodermel, S., Weiss, D., Pichersky E. (2007). Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *The Plant Cell* 19: 32-45.

Verpoorte R. (2000). Secondary Metabolism. In: Verpoorte R & Alfermann AW (eds) *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1-29.

Vidgren, J., Svensson, L.A., Liljas, A. (1994). Crystal structure of catechol *O*-methyltransferase. *Nature* 368: 354-358.

Watanabe, N., Lam, E. (2006). The hypersensitive response in plant disease resistance. *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. Edited by S. Tuzun. S. and E. Bent Springer: 83-111.

Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.

White, R.F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412.

Xu, R., Song, F., Zheng, Z. (2006). OsBISAMT1, a gene encoding S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, is differentially expressed in rice defense responses. *Molecular Biology Reports* 33: 223-231.

Yalpani, N., León, J., Lawton, M.A., Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus- inoculated Tobacco. *Plant Physiology* 103: 315-321.

Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M.A., Kleier, D.A., Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *The Plant Cell* 3: 809-818.

Yang, Y., Yuan, J.S., Ross, J., Noel, J.P., Pichersky, E., Chen, F. (2006) An *Arabidopsis thaliana* methyltransferase capable of methylating farnesoic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 448: 123–132.

Ye, Z.H., Zhong, R., Morrison, W.H., 3rd, Himmelsbach, D.S. (2001). Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase and lignin biosynthesis. *Phytochemistry* 57: 1177-1185.

Ye, Z.H., Kneusel, R.E., Matern, U., Varner, J.E. (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in Zinna. *Plant Cell* 6: 1427-1439.

Young, H., Paterson, V.J., Burns, D.J.W. (1983). Volatile aroma constituents of kiwifruit. *J. Sci. Food. Agric.* 34: 81-85.

Zhang, S., Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid activates a 48 kDa MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809-824.

Zhang, Z.-P., Baldwin, I.T. (1997). Transport of [2-¹⁴C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 203: 436-441.

Zhang, Z.-P., Krumm, T., Baldwin, I.T. (1997). Structural requirements of jasmonates and mimics for nicotine induction in *Nicotiana sylvestris*. *Journal of Chemical Ecology* 23 (12): 2777-2789.

Zhao, N., Ferrer, J.-L., Ross, J., Guan, J., Yang, Y., Pichersky, E., Noel, J.P., Chen, F. (2008). Structural, biochemical, and phylogenetic analyses suggest that indole-3-acic methyltransferase is an evolutionarily ancient member of the SABATH family. *Plant physiology* 146: 455-467.

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. *The Plant Cell* 15: 1704-1716.

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 structural biology* 8: 271-279.

6. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp ¹⁰⁰	Konzentrationsangabe, hier: Ampicillin in µg/ml
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BA	benzoic acid (Benzoessäure)
BAMT	S-Adenosyl-L-Methionin: Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferase
BS	Benzoessäure
BSMT	Benzoessäure/Salizylsäure-Carboxyl-Methyltransferase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indoylphosphat
bp	Basenpaare (nach Watson und Crick)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Carb	Carbenicillin
cDNA	komplementäre DNA
CoA	CoenzymA
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dpm	Anzahl der Zerfälle pro Minute
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
fw	forward
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HR	hypersensitive response
H ₂ O	Wasser
i. Allg.	im Allgemeinen
ICS	Isochorismat-Synthase
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

JMT	Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase
k	Kilo
kat	Katal
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Km	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
m	Milli (10^{-3})
m	meta
M	Molar
MBA	methylbenzoate/ Methylbenzoat
max.	maximal
min	Minute
μ	Mikro (10^{-6})
MMLV	Moloney murine leukemia virus
mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger</i> RNA)
MSA	methylsalicylate/ Methylsalizylat
MT	Metyltransferase
MTs	Methyltransferasen
n	Nano (10^{-9})
N	Stickstoff
nm	Nanometer
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitrotetrazoliumblau
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
o	ortho
O	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Extinktion, hier: bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt
p	Pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PR	pathogenesis related
rev	reverse
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
SA	salicylic acid (Salizylsäure)
SABP2	salicylic acid binding protein 2
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SAMT	S-Adenosyl-L-Methionin: Salizylsäure-Carboxyl-Methyltransferase
SAR	systemic acquired resistance

SDS	Natriumdodecylsulfat
spez.	spezifisch
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TdT	terminale Desoxypolynucleotidyl-Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Teramethylethylendiamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TMV	Tabakmosaikvirus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tris-HCl	Tris, mit HCl gepuffert
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
x	mal (Produkt)
z.B.	zum Beispiel
ZS	Zimtsäure
z.T.	zum Teil
%	Prozent

Abbildungs- und TabellenverzeichnisAbbildungen:

Abb. 1.1: Übersicht der mittels SAMT, BSMT und BAMT katalysierten Reaktionen.....	7
Abb. 1.2: <i>Nicotiana suaveolens</i>	16
Abb. 1.3: <i>Nicotiana alata</i>	16
Abb. 1.4: <i>Nicotiana sylvestris</i>	17
Abb. 3.1: Übersicht über die aus <i>N. suaveolens</i> mittels PCR isolierten Fragmente.....	55
Abb. 3.2: Amplifizierung zweier BSMT-ähnlicher Fragmente mittels PCR.....	56
Abb. 3.3: Expressionsüberprüfung der gefundenen BSMT-ähnlichen Sequenz (N.sua.BSMT2-1) in <i>N. suaveolens</i>	57
Abb. 3.4: Suche nach dem 3'- und 5'UTR-Bereich der BSMT-ähnlichen Sequenz der Fragmente 10 und 11 aus <i>N. suaveolens</i>	59
Abb. 3.5: Amplifizierung der BSMT-ähnlichen Sequenz (N.sua.BSMT2-1) aus <i>N. suaveolens</i> für die Ligation mit den pET SUMO-Vektor mittels RT-PCR....	60
Abb. 3.6: Aufreinigung und Nachweis der BSMT-ähnlichen Sequenz (N.sua.BSMT2-1) aus <i>N. suaveolens</i>	61
Abb. 3.7: Substratspezifität der N.suaBSMT2-1 aus <i>N. suaveolens</i>	62
Abb. 3.8: Suche nach dem 3'UTR-Bereich der BSMT1-2 aus <i>N. suaveolens</i>	63
Abb. 3.9: Aufreinigung der BSMT1-2 von <i>N. suaveolens</i>	64
Abb. 3.10: Suche nach einer potentiellen SAMT in <i>N. suaveolens</i> (N.sua.SAMT1).....	65
Abb. 3.11: Suche nach dem 5'- und 3'UTR-Bereich der N.sua.SAMT1 aus <i>N. suaveolens</i>	66
Abb. 3.12: Amplifizierung der N.sua.SAMT1 Sequenz aus <i>N. suaveolens</i> für die Ligation mit den pET 101/D-TOPO und pET SUMO-Vektor mittels RT-PCR.....	67
Abb. 3.13: Aufreinigung und Nachweis der N.sua.SAMT1 aus <i>N. suaveolens</i>	68
Abb. 3.14: Substratspezifität der N.sua.SAMT1 aus <i>N. suaveolens</i>	69
Abb. 3.15: Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen in <i>N. alata</i>	70
Abb. 3.16: Expressionsüberprüfung der potentiellen BSMT (N.ala.BSMT2-1) aus <i>N. alata</i>	70
Abb. 3.17: Suche nach dem 5'- und 3'UTR-Bereich der N.ala.BSMT2-1 aus <i>N. alata</i>	71

Abb. 3.18: Amplifizierung der N.ala.BSMT2-1 aus <i>N. alata</i> für die Ligation mit den pET SUMO Vektor mittels RT-PCR.....	72
Abb. 3.19: Aufreinigung und Nachweis der N.ala.BSMT2-1 aus <i>N. alata</i>	73
Abb. 3.20: Substratspezifität der N.ala.BSMT2-1 aus <i>N. alata</i>	74
Abb. 3.21: Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der N.ala.BSMT2-1 aus <i>N. alata</i> mittels RT-PCR.....	75
Abb. 3.22: Untersuchung der Induzierbarkeit der N.ala.BSMT2-1 durch Salizylsäure bzw. Benzoesäure.....	76
Abb. 3.23: Expressionsüberprüfung der N.ala.SAMT1 aus <i>N. alata</i>	76
Abb. 3.24: Identifizierung des 5'- und 3'UTR-Bereichs der N.ala.SAMT1 aus <i>N. alata</i>	77
Abb. 3.25: RT-PCR Fragment des komplettierten codierenden Bereichs der N.ala.SAMT1 aus <i>N. alata</i>	78
Abb. 3.26: Aufreinigung der N.ala.SAMT1 aus <i>N. alata</i>	79
Abb. 3.27: Substratspezifität der N.ala.SAMT1 aus <i>N. alata</i>	80
Abb. 3.28: Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der N.ala.SAMT1 aus <i>N. alata</i> mittels RT-PCR.....	81
Abb. 3.29: Untersuchung der Induzierbarkeit der N.ala.SAMT1 durch Salizylsäure bzw. Benzoesäure.....	82
Abb. 3.30: Expressionsüberprüfung der N.syl.BSMT2-1 aus <i>N. sylvestris</i>	82
Abb. 3.31: Suche nach dem 5'- und 3'UTR-Bereich der N.syl.BSMT2-1 aus <i>N. sylvestris</i>	83
Abb. 3.32: RT-PCR Fragment des gesamten codierenden Bereichs der N.syl.BSMT2-1 aus <i>N. sylvestris</i>	84
Abb. 3.33: Aufreinigung und Nachweis der N.syl.BSMT2-1 aus <i>N. sylvestris</i>	85
Abb. 3.34: Substratspezifität der N.syl.BSMT2-1 aus <i>N. sylvestris</i>	86
Abb. 3.35: Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der N.syl.BSMT2-1 aus <i>N. sylvestris</i> mittels RT-PCR.....	87
Abb. 3.36: Untersuchung der Regulation der N.syl.BSMT2-1 durch Salizylsäure bzw. Benzoesäure.....	87
Abb. 3.37: Expressionsüberprüfung der N.syl.SAMT1 aus <i>N. sylvestris</i>	88
Abb. 3.38: Suche nach dem 5'- und 3'UTR-Bereich der N.syl.SAMT1 aus <i>N. sylvestris</i>	89

Abb. 3.39: RT-PCR Fragment des gesamten codierenden Bereichs der N.syl.SAMT1 aus <i>N. sylvestris</i>	90
Abb. 3.40: Aufreinigung und Nachweis der N.syl.SAMT1 aus <i>N. sylvestris</i>	90
Abb. 3.41: Substratspezifität der N.syl.SAMT1 aus <i>N. sylvestris</i>	91
Abb. 3.42: Untersuchung des „steady-state Gehalts“ der N.syl.SAMT1 aus <i>N. sylvestris</i> mittels RT-PCR.....	92
Abb. 3.43: Untersuchung der Induzierbarkeit der N.syl.SAMT1 durch Salizylsäure bzw. Benzoesäure.....	93
Abb. 3.44: Aufreinigung der potentiellen BSMT aus <i>N. gossei</i> (N.gos.NAMT1-1).....	94
Abb. 3.45: Substratspezifität der N.gos.NAMT1-1 aus <i>N. gossei</i>	95
Abb. 3.46: Blütenduft aus <i>N. suaveolens</i>	96
Abb. 4.1: Stammbaum von pflanzlichen Carboxyl-Methyltransferasen.....	109
Abb. 4.2: Stammbaum von SAMTs und BSMTs aus verschiedenen Solanaceae.....	110
Abb. 6.1: Negativkontrolle: <i>E.coli</i> HMS174(DE3) ohne Plasmid mit Benzoesäure.....	177
Abb. 6.2: Negativkontrolle: <i>E.coli</i> HMS174(DE3) ohne Plasmid mit Salizylsäure.....	177
Abb. 6.3: N.sua.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.....	178
Abb. 6.4: N.suaBSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.....	178
Abb. 6.5: N.sua.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Nikotinsäure.....	179
Abb. 6.6: N.sua.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.....	179
Abb. 6.7: N.sua.SAMT1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.....	180
Abb. 6.8: N.sua.SAMT1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.....	180
Abb. 6.9: N.sua.SAMT1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.....	181
Abb. 6.10: N.ala.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.....	181
Abb. 6.11: N.ala.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.....	182

Abb. 6.12: N.ala.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Nikotinsäure.....	182
Abb. 6.13: N.ala.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.....	183
Abb. 6.14: N.ala.SAMT1 im pET101/D-TOPO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.....	183
Abb. 6.15: N.ala.SAMT1 im pET101/D-TOPO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.....	184
Abb. 6.16: N.ala.SAMT1 im pET101/D-TOPO Vektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.....	184
Abb. 6.17: N.syl.BSMT2-1 im pET101/D-TOPO in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.....	185
Abb. 6.18: N.syl.SAMT1 im pET SUMOVektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.....	185
Abb. 6.19: N.syl.SAMT1 im pET SUMOVektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.....	186
Abb. 6.20: N.syl.SAMT1 im pET SUMOVektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.....	186
Abb. 6.21: N.gos.NAMT1-1 im pET SUMOVektor in HMS174(DE3) Zellen mit Nikotinsäure.....	187
Abb. 6.22: Blütenduft aus <i>N. sylvestris</i>	187
Abb. 6.23: Blütenduft aus <i>N. sylvestris</i> (Ausschnitt aus Abb. 6.22).....	188
Abb. 6.24: Blütenduft aus <i>N. alata</i>	189
Abb. 6.25: Blütenduft aus <i>N. alata</i> (Ausschnitt aus Abb. 6.24).....	190

Tabellen:

Tab. 1.1: Übersicht über die bereits isolierten und teilweise beschriebenen Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen der SABATH-Familie.....	13
Tab. 2.1: Übersicht über die für die 5'RACE verwendeten Primer und PCR-Programme.....	33
Tab. 2.2: Für die Überexpression der potentiellen BSMTs und - SAMTs verwendeten Vektoren, Primer und Reaktionsbedingungen.....	39
Tab. 2.3: Für die Expressionsuntersuchungen verwendeten Primer.....	41
Tab. 2.4: Pipettierschema für die Erstellung einer Eichreihe.....	45
Tab. 3.1: Übersicht der im Blütenduft von <i>N. suaveolens</i> nachgewiesenen Verbindungen.....	97
Tab. 3.2: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT- und SAMT-Sequenzen.....	99
Tab. 3.3: Übersicht über die Substratspezifität der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT- und SAMT-Sequenzen, im Vergleich mit bereits beschriebenen Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen.....	100
Tab. 3.4: Übersicht der für die Substratbindung wichtigen Aminosäuren, der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT- und SAMT-Sequenzen, im Vergleich mit bereits beschriebenen Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen.....	101
Tab. 6.1: Übersicht der Identitäten, der im Rahmen dieser Arbeit isolierten BSMT- und SAMT-Sequenzen, im Vergleich mit bereits beschriebenen Salizylsäure- und Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferasen.....	151
Tab. 6.2: Übersicht über die verwendeten Primersequenzen.....	152
Tab. 6.3: Übersicht der im Blütenduft von <i>N. sylvestris</i> nachgewiesenen Verbindungen.....	188
Tab. 6.4: Übersicht der im Blütenduft von <i>N. sylvestris</i> nachgewiesenen Verbindungen (Ausschnitt).....	188
Tab. 6.5: Übersicht der im Blütenduft von <i>N. alata</i> nachgewiesenen Verbindungen.....	189
Tab. 6.6: Übersicht der im Blütenduft von <i>N. alata</i> nachgewiesenen Verbindungen (Ausschnitt).....	190

6.2 Verwendete synthetische Oligonukleotide

Tabelle 6.2: Übersicht über die verwendeten Primersequenzen.

Primername	Sequenz 5'-3'	Richtung	Funktion
NsBSMTStartFH	ATG GAA GTT GCC AAA GTT CT	fw	Suche nach BSMT-ähnlichen Sequenzen
Ns BSMT1 Start	ATG GAA GTT GCC AAA GTT CTT CA	fw	
NsBSMTstart2	ATG GAA GTT GCC AAA GTT CTT CAC ATG	fw	
Ns BSMT int2 rev	ATC TTC GTA TAA CGC TGG CA	rev	
Ns BSMT int3 rev	TCT ATT GAG CGT AAC TTG AG	rev	
Ns BSMT int3 fw	TCT CAA GTT ACG CTC AAT AG	fw	
Ns BSMT int4 fw	TCT CCA CTG GCT TTC TCG AG	fw	
Ns BSMT int5 fw	TGG TAT TGA CTG TGA TGG GCA G	fw	
Ns BSMT int6 rev	CGG AGA TGG GTA GTA TAC AG	rev	
Ns BSMT revFH	GTT TGT TTT GGT CAA GGA G	rev	
N.sylv.fw1	CTA ATG ACA AAG TCA ATA AGA GAT G	fw	
N.sylv.rev1	TCA ACT ATA TAC TTC ACT TCT GC	rev	
BSMT NTF	GCT ATG CAA AAA ACT CTA AGC	fw	
BSMT NTR	TTG CAT TCT TCG CGA ATA G	rev	
BSMT R3	TTT CCT TTG TTA TTC TCT A TT CC	rev	
New BSMT-R	CCC TTG TTA TTC TCT CTA TTC C	rev	
SAMT F1 long (FIL)	AAG TTC TTC ACA TGA ATG GWG G	fw	
BSMT1-F	AGA CTT TTC CCT TCC AAC AGT GTG	fw	
BSMT1-R	ACA ACA ACA TTG ATG CTC GTC G	rev	
BSMT2-F	CCC AGA AAC CAT TTG TAT TGC G	fw	
BSMT2-R	GCA TCG GAC GGA CCT GTA TTA C	rev	
N.sua 3'RACE	CAG TTA CAG TCT CAT GTG GCT ATC	fw	Primer zur Expressionsüberprüfung und der Identifizierung der 3'UTR- und 5'UTR-Region der verschiedenen SAMTs und BSMTs
N.sua 5'RACE	ATA GCC ACA TGA GAC TGT AAC TG	rev	
N.ala 3'RACE	GTG AGG ATC CAA CTA GCA AAG	fw	
N.ala 5'RACE	CTT TGC TAG TTG GAT CCT CAC	rev	
N.ala 5'RACE nested	GTA GTA AGC TTT AAT TAC ACT TG	rev	
Nala fw1	GGA AAT GGA GAC ATT AGC TAT GC	fw	
Nala rew1	GGA GAC AAT GAC ATT TAT GAA CTC	rev	
N.syl 5'RACE	GGA AAA TGG TAT TAA AGT CAT	rev	
N.syl 5'RACE nested	TAA AAT GAA ACT CTG GTG ACT G	rev	
N.tab 5'UTR	AGA GAG AGA AAA GAA AAA GGA AAA AAA ATG	fw	
N.tab 5'UTR2	GTG CTA TCA CAC AAA AAA AGA CAT ACA A	fw	
N.tab 3'UTR	CTA GTC GAA GGA AIT AAA TTC AGT CGA TG	rev	
alaHRO 5'RACE	GTA AGA GGA GTG GAC AAA GTG CAG	rev	
alaHRO 5'RACE nested	GTC TAG TGT AAA ATG AAC CAG CAA CTC	rev	
N.ala HRO expr. fw	AAG CCA TTT GTA TTG CAG ACT TAG	fw	
N.ala HRO expr. rev	CAA TAT CAT ACG TCC ACC TTT CAC	rev	
N.alaHRO long rev	AAA AGT GCG AAA TAA AAA AGG GGG A	rev	
N.sylHRO long rev	AAA AGC ACG AAA TAA CAA AGG GGG A	rev	
sylHRO 5'RACE nested	GTC TAG TAT AAA ATG AAC CAG CAA CTC	rev	
N.syl RACE1fwFH	TGC ACT TTG TCC ACT CCT C	fw	
oligo dT-R2-Mix	GAC TGG ACT TCA ATC AGT TAC (T) ₁₅ (N)	rev	
R2	GAC TGG ACT TCA ATC AGT TAC	rev	
sua expr rev	ATT TGT TTT GGT CAA TGA GAC	rev	Primer für die Integration der SAMTs und BSMTs in pET 101-D/TOPO- und pET SUMO Vektor
suaSAMTexprev	TTA ATT TGT TTT GGT CAA TGA G	rev	
N.syl exp fw	CAC CAT GAA GGT TGT TGA AGT TC	fw	
N.syl exp rev	ATT TCT TTT GGT CAA TGA GAC	rev	
NsBSMTStartFH	ATG GAA GTT GCC AAA GTT CT	fw	
suaHRO1exp rew	CTA GTT TCT GTT GGT CAT GTA	rev	
alaHROüefw	CAC CAT GGA AGT TGC CAA AGT TCT	fw	
alaHROüerew	GTT TCT TTT GGT CAT GGA GAT G	rev	
alaHROexpfw2	ATG GAA GTT GCC AAA GTT C	fw	
alaHROexprev2	CTA GTT TCT TTT GGT CAT GG	rev	
NgosrewSUMO	CTA GTT TGT TTT GGT CAA GGA GAC	rev	
sylSAMTexp fw	ATG AAG GTT GTT GAA GTT C	fw	
sylSAMTexprev	TTA ATT TCT TTT GGT CAA TGA G	rev	
EF1 fw1	CTT GGT GGT ATT GAC AAG CGT G	fw	Primer für Expressionsuntersuchungen
EF1 rew1	ATT TCA TCG TAC CTA GCC TTG	rev	
Nala fw1	GGA AAT GGA GAC ATT AGC TAT GC	fw	
Nala rew1	GGA GAC AAT GAC ATT TAT GAA CTC	rev	
ala HRO üe rew	GTT TCT TTT GGT CAT GGA GAT G	rev	
N.sylv.fw1	CTA ATG ACA AAG TCA ATA AGA GAT G	fw	

FH int seq fw	TCC CTT CCA ACA GTT TGC AC	fw	Primer für Sequenzierreaktionen
FH int seq rev	CCA CTT TCT CTT CTT CTA TC	rev	
HRO seq fw	ATT TAC GTG TCA AGA ACA AGT C	fw	
HRO seq rew	ACC CTT TGC TGT AGA GAT CT	rev	
M13usp	GTA AAA CGA CGG CCA GT	fw	
M13rsp	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	rev	
Ns_int_rev_IRD	CCA TAC GCC CAC CTT TCA CC	fw	
SUMO Forward	AGA TTC TTG TAC GAC GGT ATT AG	fw	
T7 Reverse	TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG	rev	
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	fw	

6.3 Isolierte Sequenzen

6.3.1 cDNA Sequenzen

6.3.1.1 Identifizierte Sequenzen aus *N. suaveolens*

Nicotiana suaveolens SAMT (N.sua.SAMT1)

cDNA Sequenz

GTGCTATCACACAAAAAAGACATACAAAAAGATCGAGAAAAGAGAAAAGAAAAAGTAAAAGAAAGAAGAAATGAAGGTTGTT
GAAGTTCTTTCACATGAATGGAGGAAGTGGAGACATTAGCTATGCAAAAAATTCCTTCGTTTCAGCAAAAGGTAATTCTCATGAC
AAAGCCTATTATAGAGCAAGCCATAACTGATCTCTACTGCAATCTCATCCCACAAAACCTATGCATAGCGGATTTGGGTTGCT
CCTCTGGAGCTAATACTTTCATAGTGGTATCAGAGCTCATTAAAATCGTCGAAAAAGAGCGAAAAGAAGCATGGGTTTCAGTCA
CCAGAGTTCATTTTAACTTCAATGACCTTCTGGAAATGACTTCAATACCATTTTCCAGTCATTGGATGTATTTCAACAAGA
TTTTAGAAAGCAAATAGGAGAAAAGTTTGGTCCATGTTTTTTTAGCGGAGTGCCTGGTTCATTCTATACTAGGCTTTTCCCTT
CCAACAGTTTGCACTTTGTTCACTCCAGTTACAGTCTCATGTGGCTATCTCAAGTTCCTGATGCAGTTGAGAATAACAAGGGG
AACATTTACATGGCAAGTACAAGTCCCCCAAGTGTTATTAAGCATACTACAAACAATATGAAAAAGATTTTTCAAATTTCT
AAAGTATCGTTCAGAAGAATTAATGAAAGGTGGGAAGATGGTTTTAACATTTTTAGGAAGAGAAAGTGAGAATCCAAC TAGCA
AAGAAATGCTGCTATATTTGGGAGCTTTTAGCCATGGCCCTCAATGAGCTGGTTGTAGAGGGATTGATAGAAGAAGAGAAAAGTG
GACTCATTCAACATTCCTCAATATACACCATCACCAGGAGAAGTGAATACGCAGTTGAGAAGGAGGGATCATTACCATTAA
TCAATTGGAAGCTACAAGAGTCCATTGGAATGCTTGAATGACAAC TACAAAAATAGTGGTTACAGTGTCTCAAGGTGTATGA
GAGCTGTGGCTGAGCCTTTGCTTGTCAGCCAATTTGGCGAGGAATTAATGGATTTAGTATTCACAAATACGAAGACATTATA
TCTGACCGCATGTCTAAAGAGAAGACAGAGTTTACAAATGTCAGTGTCTCATTGACCAAAAACAAATTAATAATGGATTATT
TCCTTCCACTAGAAATTATGTATACATATAATAAGAGTATATTTGTCTGGATTGAACGGTGTTAAATTTCTGTATT
CGCTGCTACCAGCAGATTCATGAACACTAATTCTGTAATGTTGTTTTGCACTTTCATGTGTGGCGACCCCTAA
TTTATGT(A)_n

Der codierende Bereich inklusive Stoppcodon umfasst 1077 bp. Der bekannte 5'UTR-Bereich (kursiv) beträgt abzüglich der Primersequenz 43 bp und der 3'UTR-Bereich (kursiv) 167 bp.

Aminosäure Sequenz

MKVVEVLHMNGGTGDISYAKNSFVQQKVI LMTKPI IEQAITDLYCNLIPQNL CIADLGCSSGANTFIVSELIKIVEKERKKH
 GFQSP EHFHFNFDLP GNDNFNTIFQSLDVFQQDFRQ IGEKFGPCFFSGVPGSFYTR LFPNSNLHFVHSSYS LMWLSQVPDAVE
 NNKGN IYMASTSPPSVIKAYYKQY EKDFSKFLKYRSEELMKGKGMVLTFLGRESENPTSKECCYIWELLAMALNELVVEGLIE

E EKVDSFNIPQYTPSPGVEVKYAVEKEGSFTINQLEATRVHWNACNDNYKNSGYSVSRMRAVAEPLLVSQFGEELMDLVFHKY
 EDIISDRMSKEKTEFTNVTVSLTKTN

Die N.sua.SAMT1 von *N. suaveolens* ist 358 Aminosäuren lang.

Nicotiana suaveolens BSMT2 (N.sua.BSMT2-1)

cDNA Sequenz

ATGGAAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAGAGGATAGCTATGCCAAAAATTCTTTGCTTGCGCAAAGGT
 GATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATAACTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGGAACCATTTGTATTGCGG
 ACTTAGGTTGTTTCTCTGGACCTAACACTTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAAACTATTTATGAAGAATGCAAAGCAAT
 GGCCAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGAAATGATTTCAATACCATTTCCGGTCGTTGCC
 AGCGTTCTACGAAGATTTGAGGAAACAAATGGGAGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTT
 AACTAGACTTTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTACGGTCTTCACTGGATTTCTCAAGTGCCTGATGGT
 ATAGAGGATAACAAGGAAATATTTACGTGTCAAGAACAAGTCCACCAACTGTGGTTGAAGAATATTATGAGCAATATGAAAG
 AGATTTTGTAACTTTCTTAAGCATCGTTCAAAGGAAATGGTGAAGGTGGACGTATGATATTGACAATGCTAGGTAGGAACA
 ACGAAGATCTCTACAGCAAAGGGTGTCACTACGTGTTGGAGCCTCTGGCCATGGCCCTCAAAGAGCTAGTTGTAATGGGTTTA
 CTAGAAGAAGAGAACTAAATTCATTCAACATTCCTATATACAATCCATCTCCGGCAGAAAGTGAAGTATATAGTTGAAAAGGA
 GGGATCTTTCACTATCAATGTCTTGAAACTTCAGAACTTCGTATTGATGTTTCTGATGAAACATACGGTAACACAGGTAAGT
 CTGATGCACAAAGCGACTCGTATTTTAGTGGGGTCCAGGAAATGATCACATCTCAAGATTACATCAATGATGAGTACAATGTG
 GCACAATGCTTGAGAGCTGTGACTGAGCCTTTGCTTGTGAGTCAATTTGGTACTGAATTGAATAAGGATCAAGTGTTCACAA
 ATGCAGAGAAATCTATGTCAATTGCATGGCGAAAGAGAAGACTGTATTCACAAATGTCATCATCTACATGACCAACAGAACT
AGGGCTATATTCCCCCCTTTTTTATTTGCACTTTT

Der codierende Bereich inklusive Stoppcodon umfasst 1164 bp. Die 5'UTR-Region konnte nicht ermittelt werden. Der bekannte 3'UTR-Bereich (kursiv) umfasst abzüglich der Primersequenz 8 bp.

Aminosäure Sequenz

MEVAKVLHMNEGIGEDSYAKNSLLAQKVI LMTKSIRDEAITALYRSLSPGTIC IADLGCSSGPNTFLAISGLIKTIYEECKSN
 GQKQSP EFHVFLNDLP GNDFN IFRSLPAFYEDLRKQMGDFD PNCVFTGVAGSFYTR LFP SKSLHFVHSSYGLHWISQVPDG
 IEDNKGNIYVSRTSPPTVVEEYEQYERDFVTF LKHRSKEMVKGGRMILTMLGRN NEDLYSKGCHYVLEPLAMALKELVVMGL
 LEEKLN SFNIPIYNP SPAEVKIYVEKEGSFTINVLETSELRIDVSD ETYGNTGKSDAQSDSYFSGVQEMITSQDYINDEYNV
 AQCLRAVTEPLLVSHFGTELNK DQVFNKREIYVNCMAKEKTVFTNVI IYMTNRN

Die N.sua.BSMT2-1 von *N. suaveolens* ist 387 Aminosäuren lang.

Nicotiana suaveolens* BSMT3 (N.sua.BSMT3-1)*cDNA Sequenz**

AATTTACCTAGCCAAGAAATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAGAGGCTAGCTATGCCAAAAATTC
 TTTGCTTCAGCAAAAAGGTGATCCTCATGACAAAGACAATAAGAGATAAAGCAATTTCTGCACTCTACCGCAGCCTCACCCAG
 AAACCATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTTCTCTGGGCCAATACTTTCTTGGCGGTCACCCAACCTATTAGAGTTATTTCGC
 GAAGAATCCAAAAGCAACGACCAGCAACAACCGCCACCAGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCTGGGAACGATTTTAA
 TACCATTTTCCGGTCGTTGCTGACGGAATTCTACGATGATTTGAGGGAGGAGAACACGGGAGAAGATGGATTTGATCCAAATA
 ATTGTTTTGTCTCAGGAGTTGCAGGTTCAATCTATAATAGACTTTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCTTCTTAC
 AGTCTCCACTGGCTTCTCAAGTGCCTGATGGAATAGAGAATAACAAGGGACATATATACTTGACAAGTACAAGTTCAGCAAG
 TGTGATTAAGCGTATTATGAGCAATTTGAAAGAGATTTGCGCACTTTTAAAGTGCCGGTCGATGGAATGGTGCAAAACG
 GCGGTATGATATTGACAATGTTGGGCAGAAAACAATGAAGATCTCTTTGGCAAAGGGTGTCTACGAATGGGAGCTTTTAGCC
 ACGGTCTCAAATCATCGGCGGATCAATAGAGGAGGAAAAAATGGATGCATTCAACATCTCTGTATACAATCCATCTCTCTGC
 AGAAGTGAAGTATATAGTTGA

Der bekannte codierende Bereich der N.sua.BSMT3-1 von *N. suaveolens* beträgt 833 bp. Die Länge der isolierten 5'UTR-Region (kursiv) beträgt 18 bp.

Aminosäure Sequenz

MEVAKVLHMNEGIGEASYAKNSLLQQKVIILMKTIRDKAISALYRSLTPETICIADLGCSSGPNTFLAVTQLIRVIREESKSN
 DQQQPPPEFHVFLNDLPGNDFNTIFRSLLEFYDDLREENTGEDGFDPNFCVSGVAGSFYNRLFPSKSLHFVHSSYSLHWLS
 QVPDGIENKNGHIYLTSTSSASVIKAYYEQFERDFATFLKCRSMELVQNGRMILTMLGRNNEDLFGKGCSEWELLATVLKII
 GGSIEEEKMDAFNIPVYNPSPAEVKYIV

Die Länge der isolierten Sequenz der N.sua.BSMT3-1 von *N. suaveolens* beträgt 277 Aminosäuren.

6.2.1.2 Identifizierte Sequenzen aus *N. alata****Nicotiana alata* SAMT (N.ala.SAMT1)****cDNA Sequenz**

AGCGAAGAGTGCTATCCACAAGAAAAGACATACAAAAAGATCAAGAAAAGAGAAAAGAAAAAGCAAAAAAGAAGAAATGAA
 GGTGTTGAAGTTCTTCACATGAATGGAGGAAATGGAGACATTAGCTATGCAAAAAATTCCTTGGTTTCAGCAAAAGGTGATTC
 TCATGACAAAAGCCAATAACAGAGCAAGCCATAACTGATCTCTACTGCAGTCTTTTTCCACAAAATTTATGCATTGCGGATTTA
 GGTGTTCTCTGGAGCTAATACTTTCATAGTGGTATCAGAGCTTGTTAAAATCGTCGAAAAAGAACGAAAAGAAGCACGGGTT
 TCAGTCAACCAGAGTTTCATTTTAACTTCAATGATCTTCTGGAAATGACTTTAATACCATTTTCCAGTCATTGGATATATTT
 AACAGGATTTGAGAAAAGCAATAGGAGAAGAGTTTGGTCCATGCTTTTTTAGTGGAGTTCTGGTTTATTTACTAGACTT
 TTCCCTTCCAACAGTTTGCACCTTGTTCCTCCAGTTACAGTCTCATGTGGCTATCTCAGGTTCTGATGCAGTTGAGAACAA

CAAGGGGAATATTTACATGGCAAGTACAAGTCCCCAAGTGTAAATTAAGCTTACTACAAACAATATGAAAAAGATTTTTCAA
 ATTTTCTAAAGTATCGTTCTGAAGAATTAGTGAAAGGTGGGAAGATGGTTTTAACATTTTTAGGAAGAGAAAAGTGAGGATCCA
 ACTAGCAAAGAATGCTGCTATATTTGGGAGCTTTTAGCCATGGCCCTCAATGAGTTGGTTGTAGAGGGATTGATAGAAGAAGA
 GAAAGTGGACTCATCAACATTCCTCAATATACACCATCACCAGCAGATGTGAAATACATAGTTGAGAAGGAAGGATCATTCA
 CCATTAATCAATTAGAAGCTACAAGAATCCATTGGAATGCTTGTAAATGAGAATTACAAAATGGTGGTTACGATGTCTCAAGG
 TGTATGAGAGCTGTGGCTGAGCCTTTGCTTGTGAGTCAATTTGGCGAGGAATTAATGGATTTAGTATTCATAAATACGAAGA
 GATTATATCTGACTGCATGTCTAAAGAGCAGACAGAGTTTATAAATGTCACTGTCTCATGACCAAAGAAAAT**TAA**AGGCACG
 TAGTATCAGAGGCGGATTTAGAGTGTGGTTCAATGGATTCATCGACTGAATTTATTCCTTCGACTAGAATTATGTACACGTA
 TAATAAGAGTATATTTGCTAGATTTAGTGATGTTAAATCTGAATTCGCTACTACGTGCAGATTGATGGACACCAATAATTCT
 TCTAATGTTGTTTTGCACTTTGGTATGTGTGGCCGAGCTAATAGATGTAGTCACTGTCTTGTGTACTAGGGGTACTTTCTTGG
 AAAGTTCTGTACCACAGAAAACATCTCATGTCAATTTGTTATTCAATGAAGAAAATGTGTTGTTTTG (A) n

Der codierende Bereich inklusive Stoppcodon umfasst 1077 bp. Der bekannte 5'UTR-Bereich beträgt 78 bp (kursiv) und der 3'UTR-Bereich 323 bp (kursiv).

Aminosäure Sequenz

MKVVEVLHMNGNGNDISYAKNSLVQQKVIILMTKPI TEQAITDLYCSLFPQNL CIADLGCSSGANTFIVVSELVKIVEKERKKH
 GFQSEPFHFNFNDLPGNDFNTIFQSLDIFQQDLRKQIGEEFPGPCFFSGVPGSFYTRLFPSNSLHFVHSSYSMLWLSQVPDAVE
 NNKGNIMASTSPSPVIKAYYKQYKDFSNFLKYRSEELVKGGMVLTFLGRESEDPTSKECCYIWELLAMALNELVVEGLIE
 EEKVDSEFNIPQYTPSPADVKYIVEKEGSFTINQLEATRIHWNACNENYKNGGYDVSRMRAVAEPLLVSQFGEELMDLVFHKY
 EEIISDCMSKEQTEFINVTVSLTKRN

Die N.ala.SAMT1 von *N. alata* ist 358 Aminosäuren lang.

Nicotiana alata BSMT2 (N.ala.BSMT2-1)

cDNA Sequenz

CCTAGCCAAAAATAGTATCCACCTATAGACTATTCGTATAGT**ATG**GAAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGGAGGAATTG
 GAGAAGCTAGCTATGCCAAAAATCTTTGATTGCGAAAAAGGTGATCCTGATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATAACT
 GCACTCTACCGCAACCTTTCCCCAGAAACATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTCCCTCTGGACCTAACACTTTTCTTACAAT
 TTCCAGACTCATTCAAACTATTTATGAAGAATGCAAAAAGCATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATG
 ATCTTCCCGGAAATGATTTCAATACCATTTTTTCGATCGTTGACGGCCTTCTACGATGATTTGAGGAAACAAATGAGGGATGGA
 TTTGATCCTAATGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTTACACTAGACTTTTCCCTTCTAAGAGTCTGCACTTTGTCCA
 CTCTCTTACAGTCTTCAATGGATTTCTCAAGTGCCTCATGGTATAGAGGATAACAAGGAAATATTTACGTGTCAAGAACAA
 GTCCACCAACTGTGGTTAAAGCATATTATGAGCTATATGAAAGAGATTTTGCAACTTTTCTTAAGTATCGTTCAAAGGAAGT
 GTGAAAGGTGGACGTATGATATTGACAATGCTAGGTAGGAAAAATGAAGATCTCTACAGCAAAGGGTGTACTACGTGTTGGA
 GCCTCTGGCCATGGCCCTCAAAGAGCTAGTTGCAATGGGTTTAATAGAAGAAGAGAAAGTAAATTCATTCAACATTCCTATAT
 ACAGTCCATCTCCCGAGAAGTGAAGTATGTAGTTGAAAAGGAGGGATCTTTCCTATCGATGTCTTGAAACTTCAGAACTT
 TGTATTGATGTTTTCTGATGAAACATGCGGTAATACAGGTCCGTCCGATGCACAAAACGACTTGCATTTGTGTAGGGTCCAGGA
 AATGGTCACACCCCAAGATTGCAGCAATGGTGAAGTACAATGTGGCACATTGCTTGAGAGCTGTGACTGAGTCTTTGCTTGTC
 GCCATTTTGGTACTGAATTGAATATGGATCAAGTGTCAACAAGTGCAGAGAAATCTTTGTCAATTGCATGGCGAAAGAGAAG
 ACTACATTCACAAATGTCATCATCTCCATGACCAAAGAAAC**TAGGG**CTATATTCCCCCTTTTTTATTTTCGCACTTTTAATTT

AAGGAGATGGTGGCTTATTTTTGTTATCTTTGTAAGAGATGTGTAATGGTTTCATATTGTTCTTTTATCTTTATACAAGATAC
ACTTCTGTTCACTT (A)_n

Der codierende Bereich inklusive Stoppcodon umfasst 1164 bp. Die Länge des 3'UTR-Bereichs beträgt 135 bp (kursiv). Der ermittelte 5'UTR-Bereich ist 43 bp lang (kursiv).

Aminosäure Sequenz

MEVAKVLHMNGGIGEASYAKNSLIAKKVILMTKSIKDEAITALYRNLSPETICIADLGCSSGPNTFLTISRLIQTIYEECKSD
GQKQSPFHVFLNDLPGNDFNTIFRSLTAFYDDLKQMRDGFDPNCFVTGVAGSFYTRLFPSKSLHFVHSSYSLQWISQVPHG
IEDNKGNIIYVSRTPPTVVKAYYELYERDFATFLKYRSKELVKGGRMILTMLGRKNEDLYSKGCYYVLEPLAMALKELVAMGL
IEEEKVNSFNIPYSPSPAEVKYVVEKEGSFTIDVLETSELCIDVSDETCGNTGPSDAQNDLHLCRVQEMVTPQDCSNGEYNV
AHCLRAVTESELLVSHFGTELNMDQVFNKREIFVNCMAKEKTTFTNVIISMTKRN

Die N.ala.BSMT2-1 von *N. alata* ist 387 Aminosäuren lang.

Nicotiana alata BSMT3 (N.ala.BSMT3-1)

cDNA Sequenz

TCTTCACATGAATGGAGGAATTGGAGAGGCTAGCTATGCCAAAAATCTTTGCTTCAGCAAAAAGTGATCCTCATGACAAAGA
CAATAAGAGATAAAGCCATATCTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGAAACCATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTTCATCT
GGACCTAATACTTTCTTGGTGGTCACCCAACCTATTAGAGTTATTCGGAAGAATGCAAAAGCAACGGCCAACAACAACCGCA
GCCAGAAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCTGGGAATGATTTTAATATCATTTTCTGGTTCGTTGCTGCCGGAATTCACG
ATGATTTGAGGGAGAAGAATATGGGAGAAGACGGATTTGATCCAAATAATTGTTTTGTCTCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTAT
AATAGA

Der bekannte codierende Bereich der N.ala.BSMT3-1 von *N. alata* beträgt 421 bp.

Aminosäure Sequenz

LHMNGGIGEASYAKNSLLQQKVILMTKTIRDKAISALYRSLSPETICIADLGCSSGPNTFLVVTQLIRVIREECKSNGQQQPFQ
PEFHVFLNDLPGNDFNIIIFWLLPEFYDDLREKNMGEDGFDPNCFVSGVAGSFYNR

Die Länge des bekannten codierenden Bereichs der N.ala.BSMT3-1 von *N. alata* beträgt 140 Aminosäuren.

6.3.1.3 Identifizierte Sequenzen aus *N. sylvestris*

Nicotiana sylvestris SAMT (N.syl.SAMT1)

cDNA Sequenz

GGAAGCGGAGAGTGCATATCCACAAAAAAGACATACAAAAAGATCAAGAAAAGAGAAAAGAAAAAGAAAAGAAATGAAGGT
 TGTGAAAGTTCTTACATGAATGGAGGAAATGGAGACATTAGCTATGCAAAAAATTCCTTGGTTCAGCAAAAGGTAATTCCTCA
 TGACAAAGCCAATAACAGAGCAAGCCATAACTGAACTCTACTGCAGTCTCTTCCCACAAAACCTTATGCATTGCGGATTTGGGT
 TGTTCCTATGGAGCTAATACTTTTCATAGTAGTATCAGAGCTCGTTAAAAATCGTTGAAAAAGAACGGAAGAAGCACGGGTTTCA
 GTCACCAGAGTTTCATTTTAACTTCAATGATCTTCTGGAATGACTTTAATACCATTTTCCAGTCATTGGATGTATTTCAAC
 AAGATTTGAGAAAGCAAATAGGAGAAAAAGTTTGGTCCATGCTTTTTTAGTGGAGTGCCTGGTTCATTTTATACTAGACTTTTC
 CCTTCCAACAGTTTGCACCTTTGTTCACTCCAGTTACAGTCTCATGTGGCTATCTCAAGTTCCTGATGCAGTTGAGAATAACAA
 GGGGAACATTTACATGGCAAGTACAAGTCCGCCAAGTGAATTAAGCATACTACAAACAATATGAAAAAGATTTTCCAAATT
 TTCTCAAGTATCGTTCAGAAGAATTGGTGAAAGGTGGGAAGATGGTTTTAACATTTTGTAGGAAGAGAAAGTGAGGATCCAAC
 AGCAAAGAATGCTGCTATATTTGGGAGCTTTTAGCCATGGCACTCAATGAGTTGGTTGTAGAGGGATTGATAGAAGAAGAGAA
 AGTGGACTCATTCAACATTCCTCAATATACACCATCACCAGAAGATGTGAAATACGCAGTTGAGAAGGAGGGATCATTACCA
 TTAATCAATTGGAAGCTACAAGAGTCCAATGGAATGCTTGTAAATGAGAACCACAAAAATGGTGGTTACAGTGTCTCAAGGTGT
 ATGAGAGCTGTGGCTGAGCCTTTGCTTGTGAGCCAATTTGGCGAGGAATTAATGGATTTAGCATTCCACAAATACGAAGAGAT
 TATATCTGAGTGCATGTCTAAAGAGCAAACCTGAGTTTACAATGTCACTGTCTCATTGACCAAAAGAAATTAAGGGCAGTTGG
 TACCAGAGGCGGATTTAGAGTGTGGTTCAATGTATTTCATCGACTGAATTTAATTCCTTCGACTAG

Der codierende Bereich inklusive Stoppcodon umfasst 1077 bp. Der bekannte 5'UTR-Bereich beträgt 75 bp und der 3'UTR-Bereich abzüglich der Primersequenz 51 bp (kursiv).

Aminosäure Sequenz

MKVVEVLHMNGNGNDISYAKNSLVQQKVI LMTKPI TEQAITELYCSLFPQNL CIADL GCSYGANTFIVSELVKIVEKERKKH
 GFQSP EHFHFNFDLP GNDFN TIFQSLDVFQQDLR KIQIG EKFGPCFFS GVPGSFYTRLFP SNSLHFVHSSYS LMWLSQVPDAVE
 NNKGN IYMASTSP SSVIKAYYKQY EKDFSNFLKYR SEELVKGGMVLTFLGRE SEDPTSKECCYIWELLAMALNELVVEGLIE
 EEKVD SFNIPQYTP SPEDVKYAVEKEGSFTINQLEATRVQWNACNENHKN GGYSVSR CMRAVAEPLLV SQFGEELMDLAFHKY
 EEI ISECMSKEQTEFTNVTVSLTKRN

Die N.syl.SAMT1 von *N. sylvestris* ist 358 Aminosäuren lang.

potentielle *Nicotiana sylvestris* BSMT1 (N.syl.BSMT1-1)

cDNA Sequenz

ATGACAAAGCCAATATTAGAGGAAGCCATATCTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGAAACCATTTGTATTGCAGAGTTAGG
 TTGTTCTCTGGACCTAATACTCTTTTGGTGGTCACACAACCTTATTAGCGCTATTCGCGAAGAATGCAAAAGCAACGGCCAAC
 AACAAATCGCCGGAATTTCAAATTTACTTGAATGATCTTCTGGAATGATTTTAATACCATTTTCCGCTCGTTGCCAGAAATTC
 CATGAAGATTTGAGGAGACAGAATATGGGAGATGATGGAATATTTGATCCTAATTGCTTTGTTGCAGGAGTTGCTGGTTCATT
 CTATAATAGACTTTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACCTTGTTCCTCTTACAGTCTCCACTGGCTTTCCAAGTACCTGTTG
 GAATAGAG

Der bekannte codierende Bereich der N.syl.BSMT1-1 von *N. sylvestris* beträgt 423 bp. Die isolierte Sequenz ist identisch mit der isolierten Sequenz der N.tom.BSMT1-1. Es ist denkbar, dass es sich somit bei dieser Sequenz lediglich um eine Kontamination handeln könnte.

Aminosäure Sequenz

MTKPILEEAISALYRSLSPETICIAELGCSSGPNTLLVVTQLISAIREECKSNQQQSPEFQIYLNLDLPGNDFNTIFRSLPEF
HEDLRRQNMGGDGI F D P N C F V A G V A G S F Y N R L F P S K S L H F V H S S Y S L H W L S K V P V G I E

Die Länge des bekannten codierenden Bereichs der N.syl.BSMT1-1 von *N. sylvestris* beträgt 141 Aminosäuren.

Nicotiana sylvestris BSMT2 (N.syl.BSMT2-1)

cDNA Sequenz

GATTTGCCTAGCCAAAAATACTATATTCGTATAATACAGGAAGATCCAAGAAATGGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCATATGAAT
GAAGGAATTGGAGAGGCTAGCTATGCCAAAAATTCCTTGTCTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGA
AGCCATAGCTGCACTCTACCGCAGCCTTCCCCAGAAACAATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGCTCCTCTGGACCAAACACTT
TTCTCGTAATTTCCGGACTCATTAAAATATTTATGAAGAATGCAAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTT
TTCTTGAATGATCTTCCCGGAAATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCGGCGTCTACGAAGATTTGAGGAAACAGAT
GGGAGATGGATTTGATCCTAATGCTTTGTTACCGGAGTTGCTGGTTCATTTTATACTAGACTTTTTCTTCTCAGAGTCTGC
ACTTTGTCCACTCCTCTTACAGTATCCACTGGATTTCTCAAGTGCCTGATGGTATAGAGGATAACAAGGAAGTATTTACGTG
TCAAGAAACAGTCCAACAACGTGGTTAAAGCATATATGAGCAATATGAAAGAGATTTTGTAACCTTTCTTAAGTATCGTTC
AAAGGAATTGGTAAAAGGAGGACGTATGATATTGACAATGCTAGGTAGGAACAATGAAGATCTCTACAGCAAAGGGTGTCACT
ACGTGTGGGAGCCTCTGGCCATGGCCCTCAAGGAGCTAGCTGCAATGGGTTAATAGAAAGAGAAAGTAAATTCATTC AAC
ATTCCTATATACCATCTATCTCCCGCAGAAGTGAAGTATATAGTTGAAAAGGAGGGATCTTTCACTATTGATGTCTTGAAAC
TTCGGAACCTTCATATTGATGTTTCTGATGAAACTTGCAAGTAAATACAGGTCGGTCCGGCGTACAAAGCGATTCGCATTTGTGTA
AGGACCGAGAAAAGGCCACACCCCGAGATTGCATCAATAGTGACAATATGGCAAATAGCTTGAGACCCTTGCGTGAGCCTTTG
CTTGTGACCCATTTTGGTACTGAATGAATATGGATCAAGTGTTCACAAGTGCAGAGAAATCTTTGTCAATTGCATGGCAAA
AGAGAAAAC TACATTCACAAATGTCATCATCTCCATGACCAAAAGAAAC TAGGGCTATACTCCCCCTTTGTTATTTCTGTGCTT
TTAATTTAAGGAGATGGTGCCTTAAATTGGTTATTTT (A) n

Der codierende Bereich inklusive Stoppcodon umfasst 1161 bp. Die Länge der 3'UTR-Region beträgt 68 bp (kursiv). Die Länge des 5'UTR-Bereichs beträgt 53 bp (kursiv).

Aminosäure Sequenz

MEVAKVLHMNEGIGEASYAKNSLLQKQVILMTKSIRDEAIAALYRSLSPETICIAIDLGCSSGPNTFLVISGLIKTIYEECKSN
GQKQSPHFVFLNLDLPGNDFNTIFRSLPAFYEDLRKQMGDGFDPNCFVTGVAGSFYTRLFPSQLHFVHSSYSIHWISQVPDG
IEDNKGSIIYVSRTPPTTVVKAYYEQYERDFVTFLKYRSKELVKGRMILTMLGRNNEGLYSKGCHYVWEPLAMALKELAAMGL

IEEEKVNSFNPIPIYHLSPAENVKIVEKEGSFTIDVLETSELHIDVSDETCSNTGRSGVQSDSHLCKDREKATPRDCINSNDMA
NSLRPLAEPLLVSHFGTELNMDQVFNKCREIFVNCMAKEKTTFTNVIISMTRN

Die N.syl.BSMT2-1 von *N. sylvestris* ist 386 Aminosäuren lang.

6.3.1.4 Identifizierte Sequenzen aus *N. tomentosiformis*

potentielle *Nicotiana tomentosiformis* BSMT1 (N.tom.BSMT1-1)

cDNA Sequenz

CTTCACATGAATGGAGGAATTGGAGACACAAGCTATGCAAAAACTCTAAGCTCCAGCGAAAGGTGATTCTCATGACAAAGCC
AGGATTAGAGGAAGCCATATCTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGAAACCATTTGTATTGCAGAGTTAGGTTGTTCCCTCTG
GACCTAATACTCTTTTGGTGGTCACACAACCTTATTAGCGCTATTTCGCGAAGAATGCAAAAGCAACGGCCAACAACAACAATCG
CCGGAATTTCAAATTTACTTGAATGATCTTCCTGGGAATGATTTTAATACCATTTTCCGCTCGTTGCCAAAATTCATGAAGA
TTTGAGGAGACAGAATATGGGAGATGATGGAATATTTGATCCTAATTGCTTTGTTGCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTATAATA
GACTTTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACTTTGTTCACTCCTTACAGTCTCCACTGGCTTTCCAAGTACCTGTTGGAATAGAG
AATAACAA

Der bekannte codierende Bereich der BSMT1 von *N. tomentosiformis* beträgt 506 bp. Die isolierte Sequenz ist identisch mit der isolierten Sequenz der N.syl.BSMT1-1. Es ist denkbar, dass es sich somit bei dieser Sequenz lediglich um eine Kontamination handeln könnte.

Aminosäure Sequenz

LHMNGGIGDTSYAKNSKLQRKVI LMTKPGLEEAISALYRSLSPETICIAELGCSSGPNTLLVVTQLISAIREECKSNGQQQQS
PEFQIYLNDLPGNDFNTIFRSLPKFHEDLRRQNMGDDGIFDPNCFVAGVAGSFYNRLFPSKSLHFVHSSYSLHWLSKVPVGLIE
NN

Die Länge des bekannten codierenden Bereichs der BSMT1 von *N. tomentosiformis* beträgt 168 Aminosäuren.

Nicotiana tomentosiformis BSMT2 (N.tom.BSMT2-1)

cDNA Sequenz

TGGACCTAACACTTTCCTTGCAATTTCCGAACTCATGAGAACTGTTTCTGAAGAATGCAAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGC
CGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGAAATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTCTACGAAGAT
TTGAGGAAAACAGATGGGAGATGGATTTGATCCTAATTGCTATGTTACTGGAGTTGCTGGTTCATTTTATACTAGACTTTTCCC
TTCCGAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTACAGTCTCCACTGGATTTCTCAAGTACCTGATGGTATAGAGAATAATAACA
AGGGAAATATTTACGTGTCAAGCACAAGTCCACCAACTGTGGTTAAAGCATATTTTGAGCAATATCAAAGAGATTTTGTAACT
TTTCTTAAGTATCGTTCAAAGAATTTGTGAAAGGTGGACGTATGATATTGACAATGCTAGGTAGGAAAAATGAAGATCTCTA
CAGCAAAGGGTGTCACTACGTGTTTCGAGCCTCTGGAGATGGCCCTCAAAGAGCTAGTAGCAATGGGTTTAAATAGAAGAAGA

Der bekannte codierende Bereich der BSMT2 von *N. tomentosiformis* beträgt 579 bp.

Aminosäure Sequenz

GPNTFLAISELMRTVSEECKSNGQKQSPEFHVFLNDLPGNDFNTIFRSLPAFYEDLRKQMGDGFDPNCYVTGVAGSFYTRLFP
 SESLHFVHSSYSLHWISQVPDGIENNKNKGNIVSSTSPPTVVKAYFEQYQRDFVTFLLKYRSKEFVKGGRMILTMLGRKNEDLY
 SKGCHYVFEPELEMALKELVAMGLIEE

Die Länge des bekannten codierenden Bereichs der N.tom.BSMT2-1 von *N. tomentosiformis* beträgt 192 Aminosäuren.

6.3.2 Genomische Sequenzen

Da der Zweck der Sequenzierung von genomischer DNA in der Suche von potentiellen BSMT-Sequenzen lag, wurden die meisten Fragmente nur einmal sequenziert. Aus diesem Grund sind die Sequenzen der isolierten Fragmente nicht zu 100 Prozent gesichert und können vereinzelt Sequenzierfehler aufweisen. Sofern eine isolierte genomische Sequenz von Interesse war, wurde deren Expression untersucht und die entsprechende cDNA Sequenz isoliert und mehrmals von beiden Seiten, sowie intern, sequenziert.

6.3.2.1 Identifizierte Sequenzen aus *N. suaveolens*

N. suaveolens Fragmente 1 bis 3

Die *N. suaveolens* Fragmente 1 bis 3 enthielten keine Introns und entsprachen in ihrer Sequenz der blütenspezifischen N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens*. Sie wurden mit den Primerkombinationen: Ns BSMT int4 fw - Ns BSMT revFH; Ns BSMT int4 fw - Ns BSMT int6 rev und Ns BSMT int5 fw - Ns BSMT revFH erhalten.

N. suaveolens Fragment 4

ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAAAATTCTCTGTTTCAG**GTATAATT**
ATAATTACACAACTTTTATTCTTTACAGAGGTTACACACTTTCAATTATGATTTCTTTATTTTCATTTATAGCCAGTACGA
CAAATAAATTGAACTTATTACTTTCTCTATTACATTGCATTTGTATACAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAA
 GAGATGAAGCCATAAATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCTCTGGACCT
 AATACTTTCTTACTATTTCCGAACTCATTAAAATATTTATGAAGAAAGCAAAATCGATGGCCAAAAACAGTCGCCGGGAATT
 TCAAGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGAAATGATTTCAATACCATTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGGAGATTTGAGGA
 AACATATGGGAGATGGATTTGGTACTAACTGCTTTGTGCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTATAAATAGACTTTTCCCTTCCAAC
 AGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATTCACTGCTCCACTGGCTTTCTCGAG**TATGTTTTTGTATTTAATTATGTCTTCAATACTC**
CACCTCCCTGACGTGGAGCTTAATTCTTTTGATGGCTACCATGTGTTTTAATTTATAATGGGTGGCAGTATTACCCCTGG
ATCTTTACCTACTCTAAAGTCATGTTGGAGTATGTGACCAATGTTTTTCATGCATATGGATTCTAGAAGTTGACAGATGCAATT

TCCTTATGTTACGGTACAAATTAATTTTGTGAGCCAACCTTGAAAAAAGAACTTGAAAATTTGTATGAAATCATAATCTT
TATTTATTTCTCTTTAAAGATTATTTTAAATCAATAATATATGTGTCAGATGCCAATATATGATATATAGGATAAGTTGCG
CACAAGTACATTTTGTATTCATATAGGGTCCGGAGAAGAACGGTATTTCTAGGAGAGTAATGTAAATAACCTATCATTAGCAA
GCATTAGTGGCTGCTTCACACAGAAGTAACTTTTCGTTACTCAAATGTAATAAAATATAGAGCATGTATACATGATATGAT
CATACTTATTTGAATAAGTACTAACCACAACCTAGATTGATTTCTCTCTAATAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACAAAG
GAAATATTCAAGTGCCAAAGTACAAGCCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTGTAATTTT
CTCAAGTTACGCTCAATAGA

Das *N. suaveolens* Fragment 4 hat eine Gesamtlänge von 1348 bp. Es enthält 2 Introns (kursiv) mit einer Länge von 143 bp und 588 bp. Die codierende Sequenz stimmt weitestgehend mit der N.sua.BSMT1-1 aus *N. suaveolens* überein. Es wurde mit dem Primerpaar: NsBSMTStartFH und Ns BSMT int3 rev erhalten.

N. suaveolens Fragment 5

ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAGTGAAGGAATTGGAGAGGATAGCTATGCCAAAAATCTTTGCTTCAG**GTATAAAT**
ATAATTACACAACTTTTATTTCCACATAGAGGTTATACACTCTCAATTATAATTTCTTTATTTCAATTCATAGACACACAAA
TACTACTATTTGTTAAACAATAAATTTCAAAAAATTTATAAGCACACAAAATATTATATATGTTAAGACCTACTAATTTATA
AAGTTTTATAGCCATATAAATAGAACTCAAAGCTTACTTTCTCTGTAAATTTTGTGCCAAGTCAAACCTACGACAAATAA
ATTAACCTTTCTCAATTTATATTGCATTTGTATACAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATAA
CTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGAAACCATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTCCCTCTGGACCTAACACTTTTCTCGCA
ATTTCTGGACTCATCAAACTATTTATGAAGAATGCAAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAA
TGATCTTCCCGAAATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGAT

Das *N. suaveolens* Fragment 5 hat eine Länge von 642 bp und entspricht in seiner codierenden Sequenz groÙteils der im Rahmen dieser isolierten N.sua.BSMT2-1 aus *N. suaveolens*. Das Intron (kursiv) hat eine Länge von 294 bp. Das Fragment 5 wurde mit dem Primerpaar: NsBSMTStartFH und Ns BSMT int2 rev erhalten.

N. suaveolens Fragment 6

ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAAAATCTCTGTTTCAG**GTATAAAT**
ATAATTACACAACTTTTATTTCTTTACAGAGGTTACACACTTTCAATTATGATTTCTTTATTTCAATTCATAGCCAGTACGA
CAATAAATGAACTTATTACTTTCTCTATTTACATTGCATTTGTATACAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAA
GAGATGAAGCCATATATGCACTATACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCCCTCTGGACCT
AATACTTTCTTACTATTTCCGAACCTATTAACCTATTTATGAAGAAAGCAAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTT
TCAAGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGAAATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGATTTGAGGA
AACATATGGGAGATGGATTTGGTACTAATTGCTTTGTGCAGGAGTTGCCGGTTTCTTATAATAGACTTTTCCCTTCCAAC
AGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATAACAGTCTCCACTGGCTTTCTCGAG**TATGTTTTGTATTGTTCACTACTGACAAATCCA**
TCTTGTCCACAAGTTTAAATATTAATAAAGTATAGTTTCTTTATTTAATATGTCTTCAATACACCCCTCCTTAACGTACA
AGCTTAATCTTTTGATGATCTTAGCATGTGTTTTATTTCTTCTAATAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACATAGGAAAT

ATTACGCTGGCAAGTACAAGCCCCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTTTGGAGTTTTCTCAA
GTTACGCTCAATAGA

Das *N. suaveolens* Fragment 6 hat eine Gesamtlänge von 928 bp. Es enthält 2 Introns (kursiv) mit einer Größe von 143 bp und 168 bp. Der codierende Bereich hat die höchste Ähnlichkeit zu der in Hippauf, (2004) isolierten N.sua.BSMT1-2, bei der es sich möglicherweise um ein Pseudogen handeln könnte. Es wurde mit dem Primerpaar: NsBSMTStartFH und Ns BSMT int3 rev erhalten.

Fragment 7 und 8

Das *N. suaveolens* Fragment 7 und das *N. suaveolens* Fragment 8 entsprechen dem in Hippauf, (2004) isolierten potentiellen Pseudogen (N.sua.BSMT1-2). Die Fragmente wurden mit den Primerpaaren: NsBSMTStartFH - Ns BSMT revFH und Ns BSMT int3 fw - Ns BSMT revFH erhalten.

N. suaveolens Fragment 9

ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAGGCTAGCTATACAAAAATTCTCTGTTTCAG**GTATAATT**
ATAATTACACAACTTTTATTCTTTACAGAGGTTATACACCTTCAATTATGATTTCTTTATTTTCATTTTCATAGCCAGTACGA
CAATAAATTGAACTTATTACTTTCTCTATTTAAATTGCATTTGTATACATATAGAAGAAGATAAAGTGGCTGCGTTCAATA
TTCTGTATACTACCCATCTCCTGCAGAAGTGAAGTATATAGTTGAAAAGGAGGGATCTTTCACCATTGATGTCTTGAAAAC
TCAGAAATCCATATGGATTCTTCTAATGAATACAATGCGACACAGTGCATGAGTGCTTTTACAGAGCCTTTAGTTGTCACCCA
TTTTGGTGATGAATGAATATGGATCAAGTGTTCACAAGTGCAGAGAGATATTTGACAATATCATAGCAAAAAGAGAAGACGA
CGTGCATCAATGTTGTGTCTCCTTGACCAAAACAAAC

Das *N. suaveolens* Fragment 9 hat eine Gesamtlänge von 536 bp. Es enthält ein Intron (kursiv) mit einer Größe von 143 bp. Der codierende Bereich konnte keiner der bekannten BSMTs zugeordnet werden. Das Fragment 9 wurde mit der Primerkombination: NsBSMTStartFH - Ns BSMT revFH erhalten.

N. suaveolens Fragment 10

TTCTCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAACTATTTATGAAGAATGCAAAGCAATGGCCAAAAAC
AGTCGCCGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGAAATGATTTCAATACCATTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTCTAC
GAAGATTTGAGGAAACAAATGGGAGATGGATTTGATCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTTCATTTTACTAGACT
TTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTAC**GGTCTTCACTGGATTTCTCAAGTACGTTTCATATATAATATAA**
TATTTCCCTTCGTTTCATATTTTTGAGCTAATTTGACTTGGTACGAAGTTTAAGAAAAAAGGCTTGCAGAAACATTATGATG

AAATAGTAATAAATATGTTTGTGGTGACGCTTGCACCGCCGCTGTGATGTATGTGACGACTTATCATTTGTCTGATCAATN
AAATAGCAAATAATATAGGTTAAAAGTGTGTTAATTTAATATATTTTAAAATGTGTAAATATGTTTCCAATATTTGACATTT
TATCTTATTACTCTTGAATCTCGGAATTTTACCCTTTAAATCCTCGTATCCCCTTTGACCCTTTACACTATTCCCCTTCC
ACTCTTCAAATCTTTTTCCCTGCGGTCTTGCAGCTCATTTTTGAACTAATACAAATATTCCATATGTTCCATTTCTCCCC
TTTGCTTGTCCCTTCGTATATCCCATTTCTCCTATTCTTCTCTC

Das *N. suaveolens* Fragment 10 wurde ansequenziert. Die erhaltene Länge des sequenzierten Bereichs beträgt 795 bp. Die bekannte Länge des Introns (kursiv) beträgt 506 bp. Der bekannte codierende Bereich des Fragments 10 stimmt mit der codierenden Sequenz der N.sua.BSMT2-1 überein. Es wurde mit der Primerkombination: N.sylv.fw1 – N.sylv.rev1 erhalten.

N. suaveolens Fragment 11

TTCCTCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAACCTATTTATGAAGAATGCAAAGCAATGGCCAAAAAC
 AGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGAAATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTCTAC
 GAAGATTTGAGGAAACAAATGGGAGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTTACACTAGACT
 TTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTAC **GGTCTTCACTGTGATTTCTCAAGTACGTTTCATATATAATATA**
ATATTTCCCTTCGTTTCATATTTTTTTGAGCTAATTTGACTTGGTACGAAAGTTAAAGAAAAAAGAGCTCTTTAGAAACTTATG
GTCTTTAAAGAAGAAGTCATATAAAGTCTGTGGGGCCATGTCATTTGTGTGACTATAAAAGTTTCTCATTAAAGGCCAAAAAAG
ATAAAATAAAGAGGTTAAAAGTTAAATTTATATTTAAATTTAGAAAATGTGTCACTAATTTTGGGTATGTATCTCATTTAATATG
AAA

Das *N. suaveolens* Fragment 11 wurde ansequenziert. Die erhaltene Länge des sequenzierten Bereichs beträgt 584 bp. Der bekannte codierende Bereich des Fragments 10 stimmt mit der codierenden Sequenz der N.sua.BSMT2-1 überein. Es wurde mit der Primerkombination: N.sylv.fw1 –N.sylv.rev1 erhalten.

6.3.2.1.1 Alignements

Alignment des codierenden Bereichs vom *N. suaveolens* Fragment 5 mit der N.sua.BSMT1-1 und N.sua.BSMT2-1 aus *N. suaveolens*

Fragment5	ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTACATGAGTGAAGGAATTGGAGAGGATAGCTATGCCAAA
N. sua. BSMT2-1	ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTACATGAATGAAGGAATTGGAGAGGATAGCTATGCCAAA
N. sua. BSMT1-1	ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA
	***** **
Fragment5	AATTCTTTGCTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N. sua. BSMT2-1	AATTCTTTGCTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N. sua. BSMT1-1	AATTCTCTGTTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
	***** **

```

Fragment5          ACTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGAAACCATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTCC
N.sua.BSMT2-1     ACTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGAAACCATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTCC
N.sua.BSMT1-1     TATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCCAGAAACCATTTGTATTGCGGACTTAGGATGTTCC
                   *****
Fragment5          TCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAACTATTTATGAAGAATGC
N.sua.BSMT2-1     TCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAACTATTTATGAAGAATGC
N.sua.BSMT1-1     TCTGGACCTAATACTTTCTCTACTATTTCCGAACTCATTAATACTATTTATGAAGAAAGC
                   *****
Fragment5          AAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT2-1     AAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT1-1     AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
                   ****
Fragment5          AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGAT
N.sua.BSMT2-1     AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTTACGAAGAT
N.sua.BSMT1-1     AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGAT
                   *****

```

Der codierende Bereich des *N. suaveolens* Fragment 5 zeigt hohe Übereinstimmung mit der N.sua.BSMT2-1.

Alignment des Introns aus *N. suaveolens* Fragment 5 mit dem 1. Intron des *N. suaveolens* Fragments 4

```

IntronFr.5        GTATAAATATAATTACACAACCTTTTTATTTCCACATAGAGGTTATACACTCTCAATTATA
IntronFr.4        GTATAAATTATAATTACACAACCTTTTTATTTCTTTACAGAGGTTACACACTTTCAATTATG
                   *****
IntronFr.5        ATTTCTTTATTTTCATTTTCATAGACACACAAATACTACTATTTGTTTAAACAATAAATTTTC
IntronFr.4        ATTTCTTTATTTTCATTTTCATAGCCA-----GTACGACAAATAAATTGAA-----ACTTA
                   *****
IntronFr.5        AAAAAATTTATAAGCACACAAATATTATATATGTTTAAAGACCTACTAATTTATAAAGTTT
IntronFr.4        TTACTTTCTCTATTTACATTGCATTTGTATACAG-----
                   * * * * *
IntronFr.5        TATAGCCATATAAATAGAAACTCAAAGTCTTACTTTCTCTGTAAATTTTGTGCCAAGT
IntronFr.4        -----
IntronFr.5        CAAACTACGACAAATAAATTAATACTTTCTCATTTATATTGCATTTGTATACAG
IntronFr.4        -----

```

Die Introns weisen eine hohe Identität in den ersten 85 bp auf.

Alignment der codierenden Sequenz des *N. suaveolens* Fragment 4 mit der N.sua.BSMT1-1 und der N.sua.BSMT2-1

```

Fragment4          ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA
N.sua.BSMT1-1     ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA
N.sua.BSMT2-1     ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTTCACATGAATGAAGGAATTGGAGAGGATAGCTATGCCAAA
                   *****

```

```

Fragment4      AATTCTCTGTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N.sua.BSMT1-1  AATTCTCTGTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N.sua.BSMT2-1  AATTCTTTGCTTGCGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
***** ** *
*****

Fragment4      AATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCC
N.sua.BSMT1-1  TATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCC
N.sua.BSMT2-1  ACTGCACTCTAACCGCAGCCTTTCCCCAGGAACCATTTGTATTGCAGACTTAGGTTGTTCC
***** ***** * *****
*****

Fragment4      TCTGGACCTAATACTTTTCCCTACTATTTCCGAAGTCAATTAATACTATTTATGAAGAAAGC
N.sua.BSMT1-1  TCTGGACCTAATACTTTTCCCTACTATTTCCGAAGTCAATTAATACTATTTATGAAGAAAGC
N.sua.BSMT2-1  TCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAACTATTTATGAAGAATGC
***** ***** ** * ***** * *****
*****

Fragment4      AAAATCGATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT1-1  AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT2-1  AAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
**** * *****
*****

Fragment4      AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGGAGATTTGAGGAAACAT
N.sua.BSMT1-1  AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGGAGATTTGAGGAAACAT
N.sua.BSMT2-1  AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTCTACGAAGATTTGAGGAAACAA
***** *****
*****

Fragment4      ATGGGAGATGGATTTGGTACTAAGTCTTGTTCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTATAAT
N.sua.BSMT1-1  ATGGGAGATGGATTTGGTACTAAGTCTTGTTCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTATAAT
N.sua.BSMT2-1  ATGGGAGATGGATTTGATCCTAATGCTTGTTCAGGAGTTGCTGGTTCATTTACACT
***** ***** * *****
*****

Fragment4      AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATTACAGTCTCCACTGGCTT
N.sua.BSMT1-1  AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATTACAGTCTCCACTGGCTT
N.sua.BSMT2-1  AGACTTTTCCCTTCCAAGAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTTACGGTCTTCACTGGATT
***** ***** ** *****
*****

Fragment4      TCTCGAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACAAAGGAAATATTCAAGTGGCAAGTACAAGC
N.sua.BSMT1-1  TCTCGAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACAAAGGAAATATTCAAGTGGCAAGTACAAGC
N.sua.BSMT2-1  TCTCAAGTGCCTGATGGTATAGAGGATAACAAAGGAAATATTACGTGTCAAGAACAAGT
**** ** * *****
*****

Fragment4      CCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTGTAAATTTTCTC
N.sua.BSMT1-1  CCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTGTAAATTTTCTC
N.sua.BSMT2-1  CCACCAACTGTGGTTGAAGAATATTATGAGCAATATGAAAGAGATTTTGTAACTTTTCTT
**** * *****
*****

Fragment4      AAGTTACGCTCAATAGA
N.sua.BSMT1-1  AAGTTACGCTCAATAGA
N.sua.BSMT2-1  AAGCATCGTTCAAAGGA
*** ** ***** **

```

Der codierende Bereich des *N. suaveolens* Fragment 4 hat höhere Ähnlichkeit zu der N.sua.BSMT1-1 als zu der N.sua.BSMT2-1.

Alignement des ersten Introns aus *N. suaveolens* Fragment 4 mit den ersten Intron aus *N. suaveolens* Fragment 6

```

Intron1 Fragm.4 GTATAATTATAATTACACAACCTTTTTATTTCTTTACAGAGGTTACACACTTTCAATTATG
Intron1 Fragm.6 GTATAATTATAATTACACAACCTTTTTATTTCTTTACAGAGGTTACACACTTTCAATTATG
*****

Intron1 Fragm.4 ATTTCTTTATTTCAATTTTCATAGCCAGTACGACAAATAAATTGAAACTTATTACTTTCTCT
Intron1 Fragm.6 ATTTCTTTATTTCAATTTTCATAGCCAGTACGACAAATAAATTGAAACTTATTACTTTCTCT
*****

```



```
Intron1 Fragm.4 ATTTACATTGCATTTGTATACAG
Intron1 Fragm.6 ATTTACATTGCATTTGTATACAG
*****
```

Die ersten Introns aus *N. suaveolens* Fragment 4 und *N. suaveolens* Fragment 6 sind komplett identisch.

Alignment des 2. Introns von *N. suaveolens* Fragment 4 mit dem 2. Intron von *N. suaveolens* Fragment 6

```
Intron2 Fragm.6 TATGTTTTTGTATT-----GTTTCAGTAC-----
Intron2 Fragm.4 TATGTTTTTGTATTTAATTATGTCTTCAATACTCCACTCCCTGACGTGCGAGCTTAATT
*****                **** **

Intron2 Fragm.6 -----
Intron2 Fragm.4 CTTTTGATGGCCTACCATGTGTTTTTAATTTTATAATGGGTGGCAGTATTACCCCTGGAT

Intron2 Fragm.6 -----
Intron2 Fragm.4 CTTTACCTACTCTAAAGTCATGTTGGAGTATGTGACCAATGTTTTTCATGCATATGGATTC

Intron2 Fragm.6 -----TGACAAATCCA-----
Intron2 Fragm.4 TAGAAGTTGACAGATGCAATTTCCCTTATGTTACGGTACAAATTAATTTTGTGAGCCAAC
***** ** **

Intron2 Fragm.6 -----
Intron2 Fragm.4 TGAAAAAAAAAAGAACTTGAAAATTTGTATGAAATCATAATTCCTTATTTATTTCTCTTTT

Intron2 Fragm.6 -----
Intron2 Fragm.4 AAGATTATTTTTTAAATCAATAATATATGTGTCAGATGCCAATATATGATATATAGGATA

Intron2 Fragm.6 -----
Intron2 Fragm.4 AGTTGCGCACAAAGTACATTTTGTATTTCATATAGGGTCCGGAGAAGAACGGTATTTCTAG

Intron2 Fragm.6 -----TCTTGTCACAAGTTTAAAAATATTAaaaaaaAGTAT
Intron2 Fragm.4 GAGAGTAATGTAAATAACCTATCATTAGCAAGCATTAGTGGCTGCTTCACACAGAAGTAA
*      **   ***      *   * * *****

Intron2 Fragm.6 AGTTT-CTTTATTTAATTATGTCTTCAATACACCCCTCCTTAACGT---ACAAGCTTAAT
Intron2 Fragm.4 CTTTTTCGTTACTCAAATGTAATTAaaaATATAGAGCATGTATACATGATATGATCATACT
*** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Intron2 Fragm.6 TCTTTTGATGA--TCCTA---GCATGTG--TTTTATTTCTTCTCTAATAG
Intron2 Fragm.4 TATTTTGAATAAGTACTAACCgCAACTAGATTGATTTCTCCTCTAATAG
* ***** * * ***   *** *   *** ***** *****
```

Die 2. Introns vom *N. suaveolens* Fragment 4 und *N. suaveolens* Fragment 6 weisen lediglich am Anfang und am Ende kurze übereinstimmende Bereiche auf.

Alignment der codierenden Region des *N. suaveolens* Fragments 6 mit der N.sua.BSMT1-1 und der N.sua.BSMT1-2 aus Hippauf, (2004)

```

Fragment6          ATGGAAGTTGCCAAAGTCTTCCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA
N.sua.BSMT1-2     ATGGAAGTTGCCAAAGTCTTCCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA
N.sua.BSMT1-1     ATGGAAGTTGCCAAAGTCTTCCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA
*****

Fragment6          AATTCTCTGTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N.sua.BSMT1-2     AATTCTCTGTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N.sua.BSMT1-1     AATTCTCTGTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
*****

Fragment6          TATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCC
N.sua.BSMT1-2     AATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCC
N.sua.BSMT1-1     TATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCC
*****

Fragment6          TCTGGACCTAATACTTTCCCTTACTATTTCCGAACTCATTAAAACATTTTATGAAGAAAGC
N.sua.BSMT1-2     TCTGGACCTAATACTTTCCCTTACTATTTCCGAACTCATTAAAACATTTTATGAAGAAAGC
N.sua.BSMT1-1     TCTGGACCTAATACTTTCCCTTACTATTTCCGAACTCATTAAAACATTTTATGAAGAAAGC
*****

Fragment6          AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT1-2     AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT1-1     AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
*****

Fragment6          AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGATTTGAGGAAACAT
N.sua.BSMT1-2     AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGATTTGAGGAAACAT
N.sua.BSMT1-1     AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGATTTGAGGAAACAT
*****

Fragment6          ATGGGAGATGGATTTGGTACTAATTGCTTTGTTGCAGGAGTTGCCGGTTCATTCTATAAT
N.sua.BSMT1-2     ATGGGAGATGGATTTGGTACTAATTGCTTTGTTGCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTATAAT
N.sua.BSMT1-1     ATGGGAGATGGATTTGGTACTAATTGCTTTGTTGCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTATAAT
*****

Fragment6          AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATAACAGTCTCCACTGGCTT
N.sua.BSMT1-2     AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATAACAGTCTCCACTGGCTT
N.sua.BSMT1-1     AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATTAGTCTCCACTGGCTT
*****

Fragment6          TCTCGAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACATAGGAAATATTCACGTGGCAAGTACAAGC
N.sua.BSMT1-2     TCTCGAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACATAGGAAATATTCACGTGGCAAGTACAAGC
N.sua.BSMT1-1     TCTCGAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACAAAGGAAATATTCAGTGGCAAGTACAAGC
*****

Fragment6          CCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTTTGAATTTTCTC
N.sua.BSMT1-2     CCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTTTGAATTTTCTC
N.sua.BSMT1-1     CCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTTGTAAATTTTCTC
*****

Fragment6          AAGTTACGCTCAATAGA
N.sua.BSMT1-2     AAGTTACGCTCAATAGA
N.sua.BSMT1-1     AAGTTACGCTCAATAGA
*****

```

Das *N. suaveolens* Fragment 6 hat die höchste Ähnlichkeit zu der in Hippauf, (2004) isolierten Sequenz (N.sua.BSMT1-2), bei der es sich vermutlich um ein Pseudogen handelt.

Alignment des codierenden Bereichs des *N. suaveolens* Fragments 9 mit der N.sua.BSMT1-1 und dem in Hippauf, (2004) isolierten potentiellen Pseudogen (N.sua.BSMT1-2)

```

N.sua.BSMT1-1      ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA
N.sua.BSMT1-2      ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA
Fragment9          ATGGAAGTTGCCAAAGTTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATACAAA
                    ***** * **

N.sua.BSMT1-1      AATTCTCTGTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N.sua.BSMT1-2      AATTCTCTGTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
Fragment9          AATTCTCTGTTTCAG-----
                    *****

N.sua.BSMT1-1      TATGCACTATACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCC
N.sua.BSMT1-2      AATGCACTATACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCAGACTTAGGATGTTCC
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      TCTGGACCTAATACTTTCCCTTACTATTTCCGAACTCATTAAAACATTTTATGAAGAAAGC
N.sua.BSMT1-2      TCTGGACCTAATACTTTCCCTTACTATTTCCGAACTCATTAAAACATTTTATGAAGAAAGC
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT1-2      AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGATTTGAGGAAACAT
N.sua.BSMT1-2      AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGATTTGAGGAAACAT
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      ATGGGAGATGGATTTGGTACTAATTGCTTTGTTGCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTATAAT
N.sua.BSMT1-2      ATGGGAGATGGATTTGGTACTAATTGCTTTGTTGCAGGAGTTGCTGGTTCATTCTATAAT
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATTAGTCTCCACTGGCTT
N.sua.BSMT1-2      AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATAAGTCTCCACTGGCTT
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      TCTCGAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACAAAGGAAATATTCAAGTGGCAAGTACAAGC
N.sua.BSMT1-2      TCTCGAGTACCTCATGGAATAGAGAATAACATAGGAAATATTACAGTGGCAAGTACAAGC
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      CCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTGTAAATTTTCTC
N.sua.BSMT1-2      CCACAAGATGTGGTTGAAGCATATTACGAGCAATATGAAAGAGATTTTGTAAATTTTCTC
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      AAGTTACGCTCAATAGAATTGGTGAAGGTGGGCGTATGGTATTGACTGTGATGGGCAGA
N.sua.BSMT1-2      AAGTTACGCTCAATAGAATTGGTGAAGGTGGGCGTATGGTATTGACTGTGATGGGCAGA
Fragment9          -----

N.sua.BSMT1-1      AATAATGAAGATCGCTTTAGCAAAGCTTCTTGC-TACATATTGGAGCCTATGGTCATGGC
N.sua.BSMT1-2      AATAATGAAGATCGCGTTAGCAAAGCTTCTTGC-TACCTATTGGAGCCTATGGTCATGGC
Fragment9          -----

```

```

N.sua.BSMT1-1      TCT-CAATGAGCTCATTGCAGAGGGATCAATAGAAGAAGAGAAAAGTGGCTGCGTTCAATA
N.sua.BSMT1-2      TCT-CAAAGAGCTGATTGCAGAGGGATCAATAGAAGAAGAGAAAAGTGGCTGCAATTCAATA
Fragment9          -----ATAGAAGAAGATAAAGTGGCTGCGTTCAATA
                                   *****
N.sua.BSMT1-1      TTCTGTATACTACCCATCTCCGGCAGAAGTGAAGTATATAGTTGAAAAGGAGGGATCTT
N.sua.BSMT1-2      TTCTGTATACTACCCATCTCCGGCAGAAGTGAAGTATATAGTTGAAAAGGAGGGATCTT
Fragment9          TTCTGTATACTACCCATCTCCTGCAGAAGTGAAGTATATAGTTGAAAAGGAGGGATCTT
                                   *****
N.sua.BSMT1-1      TCGCAATTGATGTCTTGAAAACCTCAGAAATCCATATGGATTCTTCTAATGAATACAATG
N.sua.BSMT1-2      TCGCCATTGATGTCTTGAAAACCTCAGAAATCCATATGGATTCTTCTAATGAATACAATG
Fragment9          TCACCATGATGTCTTGAAAACCTCAGAAATCCATATGGATTCTTCTAATGAATACAATG
                                   ** *
N.sua.BSMT1-1      TGACACAGTGCATGAGAGCTTTTATAGAGCCTTTGGTTGTCAACCATTTTGGTGATGAAT
N.sua.BSMT1-2      CGACACAGTGCATGAGAGCTTATACAGAGCCTTTAGTTGTCAACCATTTTGGTGATGAAT
Fragment9          CGACACAGTGCATGAGTGTCTTTACAGAGCCTTTAGTTGTCAACCATTTTGGTGATGAAT
                                   *****
N.sua.BSMT1-1      TGAATATGGATCAAGTGTTCACAAGTGCAGAGAGATATTTGACAATATCATAGCAAAG
N.sua.BSMT1-2      TGAATATGGATCAAGTGTTCACAAGTGCACAGAGATATTTGACAATATCATAGCAAAG
Fragment9          TGAATATGGATCAAGTGTTCACAAGTGCAGAGAGATATTTGACAATATCATAGCAAAG
                                   *****
N.sua.BSMT1-1      AGAAGACGACGAGCATCAATGTTGTTGTCTCCTTGACCAAACAAC
N.sua.BSMT1-2      AGAAGACGACGTGCATCAATGTTGTTGTCTCCTTGACCAAACAAC
Fragment9          AGAAGACGACGTGCATCAATGTTGTTGTCTCCTTGACCAAACAAC
                                   *****

```

Das *N. suaveolens* Fragment 9 stellt eine verkürzte BSMT-Version dar, die sich keiner der bekannten BSMT-Sequenzen eindeutig zuordnen lässt, dar.

Alignment des Introns aus *N. suaveolens* Fragment 9 mit den ersten Introns aus *N. suaveolens* Fragment 4 und *N. suaveolens* Fragment 6

```

Intron1 Fragm.4    GTATAATTATAATTACACAACCTTTTTATTTCTTTACAGAGGTTACACACTTTCAATTATG
Intron1 Fragm.6    GTATAATTATAATTACACAACCTTTTTATTTCTTTACAGAGGTTACACACTTTCAATTATG
Intron1 Fragm.9    GTATAATTATAATTACACAACCTTTTTATTTCTTTACAGAGGTTATACACCTTCAATTATG
                                   *****
Intron1 Fragm.4    ATTTCTTTATTTTCATTTTCATAGCCAGTACGACAAATAAATTGAAACTTATTACTTTCTCT
Intron1 Fragm.6    ATTTCTTTATTTTCATTTTCATAGCCAGTACGACAAATAAATTGAAACTTATTACTTTCTCT
Intron1 Fragm.9    ATTTCTTTATTTTCATTTTCATAGCCAGTACGACAAATAAATTGAAACTTATTACTTTCTCT
                                   *****
Intron1 Fragm.4    ATTTACATTGCATTTGTATACAG
Intron1 Fragm.6    ATTTACATTGCATTTGTATACAG
Intron1 Fragm.9    ATTTAAATTGCATTTGTATACAT
                                   *****

```

Das Intron aus *N. suaveolens* Fragment 9 entspricht bis auf 4 Austausche dem Intron der *N. suaveolens* Fragmente 4 und 6.

Alignment der codierenden Region des *N. suaveolens* Fragments 10 mit der N.sua.BSMT1-1 und der N.sua.BSMT2-1

```

Fragment10 -----
N.sua.BSMT2-1 ATGGAAGTTGCCAAAGTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAGAGGATAGCTATGCCAAA
N.sua.BSMT1-1 ATGGAAGTTGCCAAAGTCTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAAA

Fragment10 -----
N.sua.BSMT2-1 AATTCTTTGCTTGCGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N.sua.BSMT1-1 AATTCTCTGTTTCAGCAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA

Fragment10 -----TTCC
N.sua.BSMT2-1 ACTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGGAACCATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTCC
N.sua.BSMT1-1 TATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCGGACTTAGGATGTTCC
*****

Fragment10 TCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAAACTATTTATGAAGAATGC
N.sua.BSMT2-1 TCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAAACTATTTATGAAGAATGC
N.sua.BSMT1-1 TCTGGACCTAATACTTTCCCTTACTATTTCCGAACCTATTAACACTATTTATGAAGAAGC
*****

Fragment10 AAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT2-1 AAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT1-1 AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
*****

Fragment10 AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTCTACGAAGATTTGAGGAAACAA
N.sua.BSMT2-1 AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTCTACGAAGATTTGAGGAAACAA
N.sua.BSMT1-1 AATGATTTCAATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGATTTGAGGAAACAT
*****

Fragment10 ATGGGAGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTACACT
N.sua.BSMT2-1 ATGGGAGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTACACT
N.sua.BSMT1-1 ATGGGAGATGGATTTGGTACTAATTGCTTTGTTGACAGGAGTTGCTGGTTCATTTACACT
*****

Fragment10 AGACTTTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTAC-----
N.sua.BSMT2-1 AGACTTTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTACGGTCTTCACTGGATT
N.sua.BSMT1-1 AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACTTTGTCCACTCCTCATTCAGTCTCCACTGGCTT
*****

```

Der codierende Bereich des *N. suaveolens* Fragments 10 stimmt mit dem der N.sua.BSMT2-1 überein.

Alignment des Introns vom *N. suaveolens* Fragment 10 mit dem 2. Intron des *N. suaveolens* Fragments 4

```

Intron Fragm.10 -----GGTCTTCA---CTGGATTTCTCAA---GTACGTTTCATAT
Intron2 Fragm.4 TATGTTTTTGATTTAATTATGTCTTCAATACTCCACTCCCTGACGTGCGAGCTTAATTC
*****

Intron Fragm.10 ATAATATAATATTTTCCCTTCGTTTCATATTTTTTGA--GCTAATTTGACTTGGTACGAAGT
Intron2 Fragm.4 TTTTGATGGCTACCATGTGTTTTAATTTTATAATGGGTGGCAGTATTACCCCTGGATC
* * * * *

```

```

Intron Fragm.10 TTAAGAAAAA--AAAGGCTTGCAGAACATTATGATGAATATAGTAATAAATATGT-TTGT
Intron2 Fragm.4 TTTACCTACTCTAAAGTCATGTTGGAGTATGTGACCAATGTTTTCATGCATATGGATTCT
      * * * * *
Intron Fragm.10 GG----TGACGCTTGACCCGCGCCGCTGTGATG-TATGTGACGACTTATCA--TTGTCTG
Intron2 Fragm.4 AGAAGTTGACAGATGCAATTTCCCTTATGTTACGGTACAAATTAATTTTGTGAGCCAACTT
      * * * * *
Intron Fragm.10 ATCAATNAAATAGC----AAAATAATATAGGTTAAAAGTGTGTTAATT-----TA
Intron2 Fragm.4 GAAAAAAAAGAACTTGAAAAATTTGTATGAAATCATAATTCCTTATTATTCTCTTTTA
      * * * * *
Intron Fragm.10 A---TATATTTTAAAATGTGTAATATGTTTC-----CAATATTTGACATTTTATCTTA
Intron2 Fragm.4 AGATTATTTTAAATCAATAATATATGTTGTCAGATGCCAATATATGATATATAGGATAA
      * * * * *
Intron Fragm.10 -TACTCTTGA----ATCTCGAATTTTAC-----CCTTTAAATCCTCGTATTCCTTTT
Intron2 Fragm.4 GTTGCACACAGTACATTTTGTATTCATATAGGGTCCGGAGAAGAACGGTATTCTAGGA
      * * * * *
Intron Fragm.10 TGACCCTTTACACTATTCCTTTT--CCACTCTTCCAAATTCCTTTTCCCTGCGGTCCTT
Intron2 Fragm.4 GAGTAATGTAAATAACCTATCATTAGCAAGCATTAGTGGCTGCTTCACACAGAAGTAACT
      * * * * *
Intron Fragm.10 GCAGCTCATTTTGAACATAACAATATCCATATGT-TCCATTTCTCCCTTTGCTTG
Intron2 Fragm.4 TTTTCGTTACTCAAATGTAATTAATAATATAGAGCATGTATACATGATATGATCATACTTA
      * * * * *
Intron Fragm.10 TCCC---TTCGTCATATTCCTTTTCT-CCTATTTCTTCTCTC---
Intron2 Fragm.4 TTTTGAATAAGTACTAACCGCACTAGATTTGATTTCTCCTCTAATAG
      * * * * *

```

Zwischen den Sequenzen des Introns aus dem *N. suaveolens* Fragment 10 und dem 2. Intron des *N. suaveolens* Fragments 4 gibt es keine signifikanten Übereinstimmungen.

Alignement der codierenden Region des *N. suaveolens* Fragments 11 mit der N.sua.BSMT1-1 und der N.sua.BSMT2-1

```

Fragment11 -----
N.sua.BSMT2-1 ATGGAAGTTGCCAAAGTCTTTCACATGAATGAAGGAATTGGAGAGGATAGCTATGCCAA
N.sua.BSMT1-1 ATGGAAGTTGCCAAAGTCTTTCACATGAATGAAGGAATTGGAAAGGCTAGCTATGCCAA

Fragment11 -----
N.sua.BSMT2-1 AATTCTTTGCTTGCAGAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N.sua.BSMT1-1 AATTCTCTGTTTCAGCAAAAAGGTGATCCTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA

Fragment11 -----TTCC
N.sua.BSMT2-1 ACTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGGAACCATTTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTCC
N.sua.BSMT1-1 TATGCACTATAACCGCAGCCTTTCCCCAGAAGCCATTTGTATTGCGGACTTAGGATGTTCC
      * * * * *

Fragment11 TCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAACTATTTATGAAGAATGC
N.sua.BSMT2-1 TCTGGACCTAACACTTTTCTCGCAATTTCTGGACTCATCAAACTATTTATGAAGAATGC
N.sua.BSMT1-1 TCTGGACCTAATACTTTCTTACTATTTCCGAACCTATTAACACTATTTATGAAGAAAGC
      * * * * *

Fragment11 AAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT2-1 AAAAGCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.sua.BSMT1-1 AAAATCAATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTCAAGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
      * * * * *

```

```

Fragment11      AATGATTTC AATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTCTACGAAGATTTGAGGAAACAA
N.sua.BSMT2-1  AATGATTTC AATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTCTACGAAGATTTGAGGAAACAA
N.sua.BSMT1-1  AATGATTTC AATACCATTTTCCGGTCGTTGCCAGCGTTATACGAAGATTTGAGGAAACAT
                *****
Fragment11      ATGGGAGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTTACACT
N.sua.BSMT2-1  ATGGGAGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTTACACT
N.sua.BSMT1-1  ATGGGAGATGGATTTGTTACTAATTGCTTTGTTGCAGGAGTTGCTGGTTCATTTCTATAAT
                ***** * *****
Fragment11      AGACTTTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACCTTTGTCCACTCCTCTTAC-----
N.sua.BSMT2-1  AGACTTTTCCCTTCCAAGAGTCTGCACCTTTGTCCACTCCTCTTACGGTCTTCACTGGATT
N.sua.BSMT1-1  AGACTTTTCCCTTCCAACAGTGTGCACCTTTGTCCACTCCTCATTCACTCCACTGGCTT
                ***** *** *****

```

Der codierende Bereich des *N. suaveolens* Fragments 11 stimmt mit der N.sua.BSMT2-1 überein.

Alignment des Introns vom *N. suaveolens* Fragment 11 mit dem Intron des *N. suaveolens* Fragments 10

```

Intron Fragm.10 GGTCTTCACTG-GATTTCTCAAGTACGTTTCATATATAATATAATATTTTCCTTCGTTTCA
Intron Fragm.11 GGTCTTCACTGTGATTTCTCAAGTACGTTTCATATATAATATAATATTTTCCTTCGTTTCA
                *****
Intron Fragm.10 TATTTTTTGTAGCTAATTTGACTTGGTACGAAGTTAAGAAAAAAGGCT--TGCGAAAC
Intron Fragm.11 TATTTTTTGTAGCTAATTTGACTTGGTACGAAGTTAAAGAAAAAAGAGCTCTTTTAGAAA
                ***** *** * **
Intron Fragm.10 ATTATGATGAATATAGTAATAAATATGTTTGTGGTACGCTTGCACCGCGCGCTGTGAT
Intron Fragm.11 CTTATGGTCTTTAAAGAAGAGTCATAT-----AAAGTCTGTG--GGGCCA-TGTCAT
                ***** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Intron Fragm.10 GTATGTGACGACTTATCATTGTCTGATCAATNAAATAGCAAAATAATATAGGTTAAAAGT
Intron Fragm.11 TTGTGTGACTA--TAAAAGTTTCTCATTAAAG----GCAAAA-AAGATAAAATAAAGAG
                * ***** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Intron Fragm.10 GTGTTAATTTAATATATTTTTAAAATGTGTAATATGTTTCCAATATTTGACATTTTATCT
Intron Fragm.11 GTTAAAAGTTAAATTATATTTAAAATTAGAAAATGTGTCACTAATTTGGGTATGT-ATCT
                ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Intron Fragm.10 TATTACTCTTGAATCTCGGAATTTTACCCTTTAAATCCTCGTATCCCCTTTTGACCCTT
Intron Fragm.11 CATTTAATATGAAA-----
                *** **
Intron Fragm.10 TACACTATCCCTTTCCACTCTTCCAAATCTTTTCCCTGCGGTCTTGCAGCTCATT
Intron Fragm.11 -----
Intron Fragm.10 TTTGAACTAATACAAATATTCATATGTTCCATTTCTCCCCTTTGCTTGTCCCTTCGTCA
Intron Fragm.11 -----
Intron Fragm.10 TATTCCCATTCTCCTATTCTCTCTCTC
Intron Fragm.11 -----

```

Die Introns der *N. suaveolens* Fragmente 10 und 11 weisen nur in den ersten ca. 100 bp eine hohe Identität auf.

6.3.2.2 Identifizierte Sequenzen aus *N. alata*

Isolierte genomische Sequenz

CTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATAACTGCACTCTACCGCAACCTTTCCCGAGAAACCATTGTATTGCGGACTT
 AGGTTGTTCTCTGGACCTAACACTTTTCTTACAATTTCCAGACTCATTCAAACCTATTTATGAAGAATGCAAAAAGCGATGGCC
 AAAAAAGTCCGCGAATTTTCATGTTTCTTGAATGATCTTCCCGGAAATGATTTCAATACCATTTTTCGATCGTTGACGCG
 TTCTACGATGATTTGAGGAAACAAATGAGGGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTTACAC
 TAGACTTTTCCCTTCTAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTACAGTCTTCAATGGATTTCTCAAG**TACGTTTCATATACT**
CCCTCCGTTTCATATTGTTTGAGGTATCTATCTTCATAAGGTAAGGGTAGCGTCTGTATATGCATTATCCTTTTCAGAACCTG
CTTTTCAGATTATACTGGATTATTGTTGTTATTTCAATCTTTAATTTTTCTCTTATTAAATTATTATTTGAAAGCATTGTAT
ATCTAGGCTTCAGAAGCATATCCAGGGTATAGGTTCTACAGGTTAAGTAAACGACTTTCGGATCGAATATATACACAATAAG
ATCATATTTATTCTGAACAGCGCGCTAATATATACGATTTGAATTCAGACTTGTGATATATAGGTCCTCATGGTATAGAGG
 ATAACAAGGGAAATATTTACGTGTCAAGAACAAGTCCACCAACTGTGGTTAAAGCATATTTATGAGCTATATGAAAGAGATTTT
 GCAACTTTTCTTAAGTATCGTTCAAAGGAACTGGTCAAAGGTGGACGTATGATATTGACAATGCTAGGTAGGAAAAATGAAGA
 TCTCTACAGCAAAGGGTGTACTACGTGTTGGAGCCTCTGGCCATGGCCCTCAAAG**AGCTAGTTGCAATGGTAAACCCAGACA**
AATTTAATATATACATATCATAGACATATGAATACCATTTTTCTAAAACATAATTTGCATCTATCTTGAAAAACTATAAAA
AATATTAATTATATTTCTGTGTACTATTTCTTAATTTATTTCAATTTTATGTGGCAGAGTTTGATTATGCCATGATATTTATAT
GATTAAACAGTTCAGTGAGCTCAGTAGTTTTTGCTCAAAGGTAATAATATACATATTAAGAAATATACTAAATATTTCTTAA
ATTTGATTGTGAACCTAGCTATTATTACATATTAACCTTAGGTCGCTGTAGCCGTATAGGTACCCATAAACTTAAATCCTAAA
TCCGTCCTTTGCATGTCAGTAATGGCATGAAAAGTTAAGATAAATTAGTTTTATTAATTAAGTTTACTATTTGTGAATTAG
TATCACGTAAAATAGACAGAAAGAATACAACATTTGAATTTCAAATTCGCAATCCAATTTATTACGAGCGATAAGTTTTTTA
ATTGACCTAATAGTATAAAAAGATTTGCATTATAATATATAGAAGTTAGCCTCATAATGTATTTTCATTATTAATATGCAGCT
 AGTTGCAATGGGTTTAAATAGAAGAAGAAAGTAAATTCATTCAACATTCCTATATACAGTCCATCTCCCGCAGAAGTGAAGT
 ATATAGTTGA

Die Länge der isolierten genomischen Sequenz von *N. alata* beträgt 1670 bp. Das Fragment besitzt 2 Introns (kursiv) mit einer Länge von 329 bp und 604 bp. Der codierende Bereich der isolierten Sequenz entspricht der N.ala.BSMT2.

6.3.2.2.1 Alignements

Alignment der codierenden Region der isolierten *N. alata* Sequenz und der N.ala.BSMT2

N.ala Fragm.	-----
N.ala.BSMT2-1	ATGGAAGTTGCCAAAGTCTTTCACATGAATGGAGGAATTGGAGAAGCTAGCTATGCCAAA
N.ala Fragm.	-----CTAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
N.ala.BSMT2-1	AATTCCTTGATTGCGAAAAAGGTGATCCTGATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATA
	* * * * * * * * * *
N.ala Fragm.	ACTGCACTCTACCGCAACCTTTCCCGAGAAACCATTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTCC
N.ala.BSMT2-1	ACTGCACTCTACCGCAACCTTTCCCGAGAAACCATTGTATTGCGGACTTAGGTTGTTCC
	* * * * *


```

N.ala Fragm.      TCTGGACCTAACACTTTTCTTACAATTTCCAGACTCATTCAAACATTTTATGAAGAATGC
N.ala.BSMT2-1    TCTGGACCTAACACTTTTCTTACAATTTCCAGACTCATTCAAACATTTTATGAAGAATGC
                  *****

N.ala Fragm.      AAAAGCGATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
N.ala.BSMT2-1    AAAAGCGATGGCCAAAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGGA
                  *****

N.ala Fragm.      AATGATTTCAATACCATTTTTTCGATCGTTGACGGCGTTCTACGATGATTTGAGGAAACAA
N.ala.BSMT2-1    AATGATTTCAATACCATTTTTTCGATCGTTGACGGCGTTCTACGATGATTTGAGGAAACAA
                  *****

N.ala Fragm.      ATGAGGGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTTACACT
N.ala.BSMT2-1    ATGAGGGATGGATTTGATCCTAATTGCTTTGTTACAGGAGTTGCTGGTTCATTTTACACT
                  *****

N.ala Fragm.      AGACTTTTCCCTTCTAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTACAGTCTCAATGGATT
N.ala.BSMT2-1    AGACTTTTCCCTTCTAAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTCTTACAGTCTCAATGGATT
                  *****

N.ala Fragm.      TCTCAAGTACGTTTCATATACTCCCTCCGTTTCATATTGTTGAGGTATCTATCTTCATA
N.ala.BSMT2-1    TCTCAAG-----
                  *****

```

Der codierende Bereich der isolierten genomischen Sequenz aus *N. alata* ist mit der N.ala.BSMT2-1 identisch.

Alignment des 1. Introns der isolierten genomischen Sequenz von *N. alata* mit den Introns vom *N. suaveolens* Fragment 10 und *N. suaveolens* Fragment 11

```

Intron Fragm.10  GGTCTTCACTG-GATTTCTCAAGTACGTTTCATATATAATATAATATTTTCCTTCGTTTCA
Intron Fragm.11  GGTCTTCACTGTGATTTCTCAAGTACGTTTCATATATAATATAATATTTTCCTTCGTTTCA
Intron1 N. alata-----TACGTTTCATATAC-----TCCCTCCGTTTCA
                  *****                               * ** *****

Intron Fragm.10  TATTTTTTGAG----CTAATTTGACTTGGTACGAA----GTTTAAAGAAAAAAGGCT--
Intron Fragm.11  TATTTTTTGAG----CTAATTTGACTTGGTACGAA----GTTTAAAGAAAAAAGAGCTCT
Intron1 N. alataTATTGTTTGAGGTATCTATCTCATAAGGTAAGGTTAGCGTCTGTATATGCATATCCTT
                  **** *      * * * * *      * *      * *      *

Intron Fragm.10  TCGGAAACATTATGATGAATATAGTAATAAATAT-GTTTGTGGTGACGCTTGACCCGCGC
Intron Fragm.11  TTTAGAAACTTATGGTCTTTAAAGAAGAAGTCAT-AT-----AAAGTCTGTG--GGGC
Intron1 N. alataTTCAGAACCCTGCTTTTCAGATTATACTGGATTATTGTTGTTATTCAATCTTTA--ATTT
                  *  * * * * *      *      * * *      *

Intron Fragm.10  CGCTGTGATGTATGTGACGACTTATCATTGTCTGATCAATNAAATAGCAAAATAATAT--
Intron Fragm.11  CA-TGTCATTTGTGTGACTA--TAAAAGTTTCTCATTAAG-----GCAAAA-AAGAT--
Intron1 N. alataTTCTCTTAT-TAAATTATTATTGAAAGCATTGTATATCTAGGCTTCAGAAGCATATCC
                  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Intron Fragm.10  AGGTTAAAAGTGTGTTAATTTAATATATTTTAAAATGTGT--AAATATGTTTCCAATATT
Intron Fragm.11  AAAATAAAGAGGTTAAAAGTTAAATTATATTTAAAATTAGA--AAATGTGTCACTAATTTT
Intron1 N. alataAGGGTATAGGTTCTACAGGTTTAAAGTAAACGACTTTCGGATCGAATATATACCAATAA-
                  *  * * *      * * * * * * * * * * * * * * *

Intron Fragm.10  TGACATTTTATCTTATTACTCTTGAATCTCGGAATTTTACCCTTTAAATCCTCGTATTCC
Intron Fragm.11  GGGTATGT-ATCTCATTTAATATGAAA-----
Intron1 N. alataGATCATAT---TTATTCTGAACAGCGCGCTAATATATACGATTTGAATTCATGACTTGT
                  * * *      * * *

```

```
Intron Fragm.10 CCTTTTGACCCTTTACACTATTCCCCTTTCCACTCTTCCAAATTCTTTTTCCCTGCGGTC
Intron Fragm.11 -----
Intron1 N. alataGATATATAGG-----
```

```
Intron Fragm.10 CTTGCAGCTCATTTTTGAACATAATAAAATATTCATATGTTCCATTTCTCCCCTTTGCT
Intron Fragm.11 -----
Intron1 N. alata-----
```

```
Intron Fragm.10 TGTCCCTTCGTCATATTCACATTTCTCCTATTCTCTTCTCTC
Intron Fragm.11 -----
Intron1 N. alata-----
```

Das 1. Intron der isolierten genomischen Sequenz aus *N. alata* weist nur im Anfangsbereich kurze übereinstimmende Bereiche mit den Introns der *N. suaveolens* Fragmente 10 und 11 auf.

6.3.2.3 Identifizierte Sequenzen aus *N. sylvestris*

```
TAATGACAAAGTCAATAAGAGATGAAGCCATAGCTGCACTCTACCGCAGCCTTTCCCCAGAAACAATTTGTATTGCGGACTTA
GGTTGCTCCTCTGGACCAACACTTTTCTCGTAATTTCCGGACTCATTAAAACATTTATGAAGAATGCAAAAGCAATGGCCA
AAAACAGTCGCCGGAATTTTCATGTTTTCTTGAATGATCTTCCCGAAATGATTTCAATACCATTTCCGGTCGTTGCCGGCGT
TCTACGAAGATTTGAGGAAACAGATGGGAGATGGATTTGATCCTAATGCTTTTGTACCGGAGTTGCTGGTTCATTTTATACT
AGACTTTTTCTTCTCAGAGTCTGCACTTTGTCCACTCCTTTACAGTATCCACTGGATTTCTCAAGTCCTGATGGTATAGA
GGATAACAAGGGAAGTATTTACGTGTCAAGAACAAGTCCAACAACCTGTGGTTAAAGCATATTATGAGCAATATGAAAGAGATT
TTGTAACTTTTCTTAAAGTATCGTTCAAAGGAATGGTGAAAGGAGGACGTATGATATTGACAATGCTAGGTAGGAACAATGAA
GATCTCTACAGCAAAGGGTGTCACTACGTGTGGGAGCCTCTGGCCATGGCCCTCAAGGAGCTAGCTGCAATGGGTTTAAATAGA
AGAAGAGAAAGTAAATTCATTCAACATTCCTATATACCATCTATCTCCCGCAGAAGTGAAGTATATAGTTGA
```

Die Länge der isolierten genomischen Sequenz von *N. sylvestris* beträgt 737 bp. Sie wurde mit der Primerkombination: N.sylv.fw1 - N.sylv.rev1 erhalten. Sie enthält keine Introns und entspricht der N.syl.BSMT2 Sequenz.

6.4 GC-MS Analysen

6.4.1 Testung der heterolog exprimierten Enzyme mit verschiedenen Substraten

Mittels GC-MS Analysen sollte untersucht werden, unter welchen Versuchsbedingungen während der Überexpression aktives Enzym gebildet wird, weiterhin konnte damit zweifelsfrei die entstandenen Produkte nachgewiesen werden.

Für die Untersuchungen wurde zu der *E. coli*-Flüssigkultur bei der Induktion mit IPTG zusätzlich das zu testende Substrat (1 mM Endkonzentration) zugesetzt. Anschließend

erfolgte eine Inkubation von 20 h. Als Negativkontrollen wurde das Hauptsubstrat zu nicht-induzierten Zellen, bzw. Zellen die kein Plasmid enthielten, gegeben. Bei den GC-MS Messungen wurde immer auch Indol nachgewiesen. Diese Verbindung wird natürlicher Weise von allen *E. coli*-Zellen gebildet (Schlegel, 1992; Dudareva et al., 2000).

E. coli HMS174 (DE3) ohne Plasmid + Benzoesäure (Negativkontrolle)

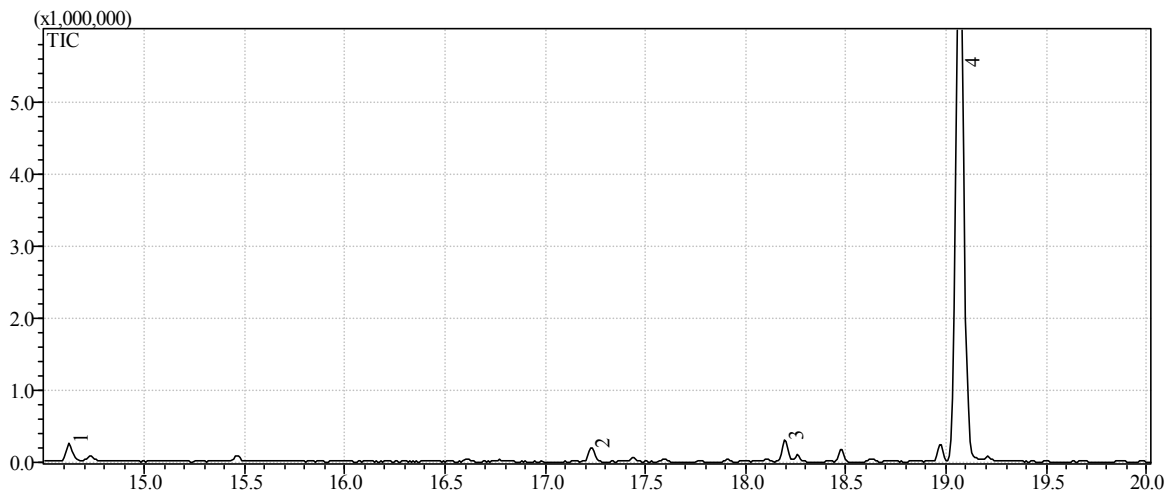


Abbildung 6.1: Negativkontrolle: *E. coli* HMS174(DE3) ohne Plasmid+ Benzoesäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Benzoesäure hinzugegeben. Es konnte kein Methylbenzoat, Methylsalizylat und Methylnikotinat nachgewiesen werden. Identifizierte Verbindungen: n-Nonan (peak 1); n-Dekane (peak 2); Benzen, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)- (peak 3); Indol (peak 4).

E. coli HMS174 (DE3) ohne Plasmid + Salizylsäure (Negativkontrolle)

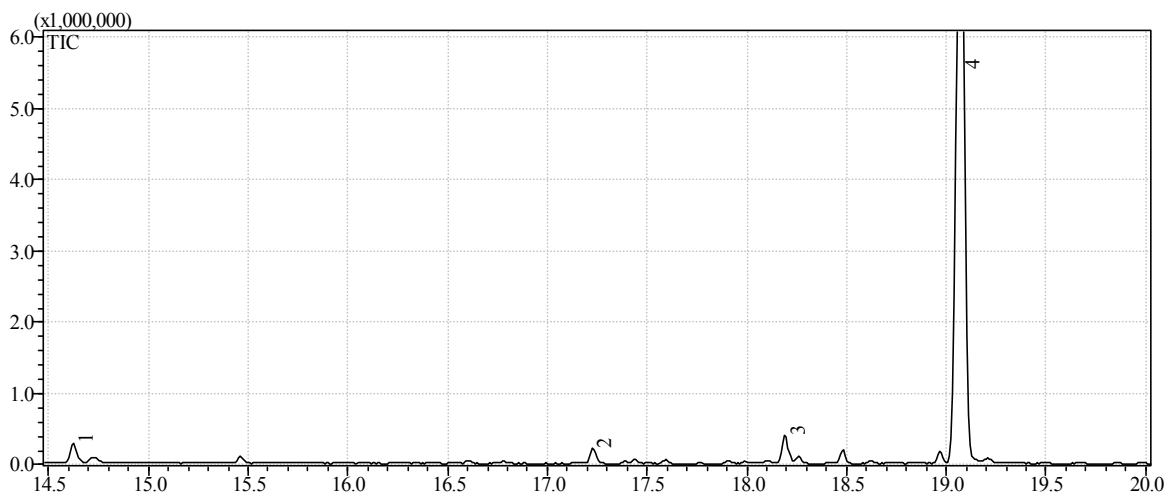


Abbildung 6.2: Negativkontrolle: *E. coli* HMS174(DE3) ohne Plasmid+ Salizylsäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Salizylsäure hinzugegeben. Es konnte kein Methylbenzoat, Methylsalizylat und Methylnikotinat nachgewiesen werden. Identifizierte Verbindungen: n-Nonan (peak 1); n-Dekane (peak 2); Benzen, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)- (peak 3); Indol (peak 4).

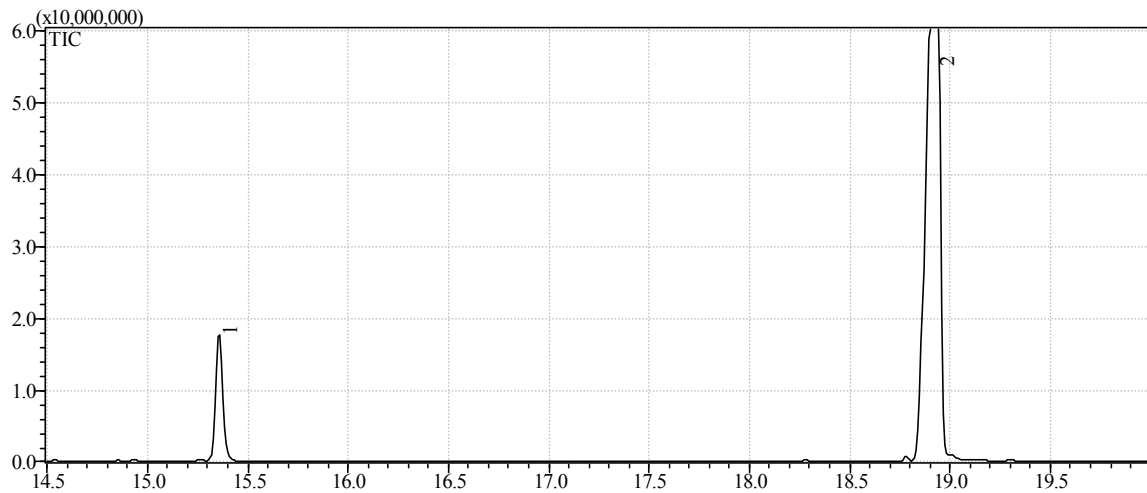
N.sua.BSMT2-1 + Benzoesäure

Abbildung 6.3: N.sua.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Benzoesäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Indol (peak 2).

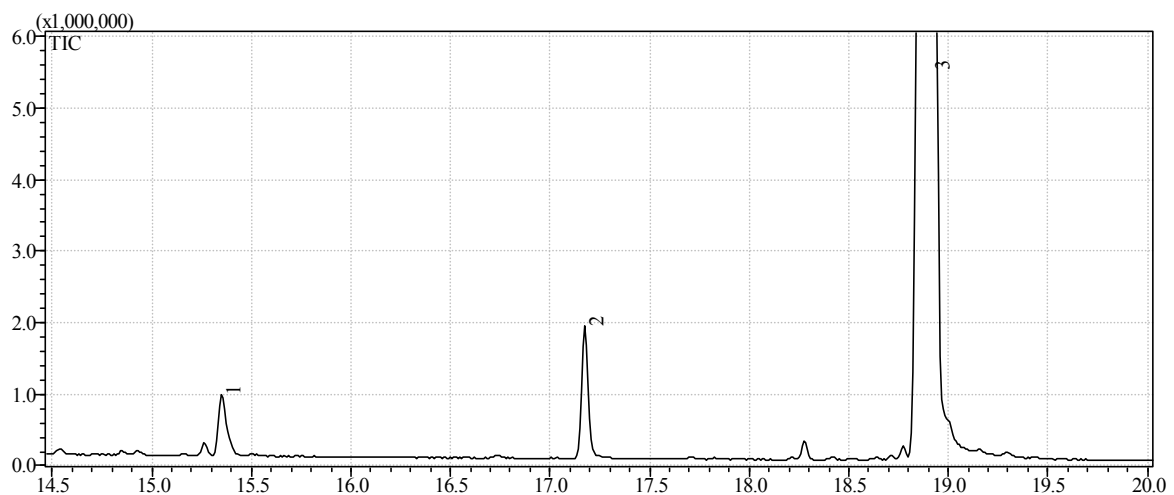
N.sua.BSMT2-1 + Salizylsäure

Abbildung 6.4: N.sua.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Salizylsäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Indol (peak 3).

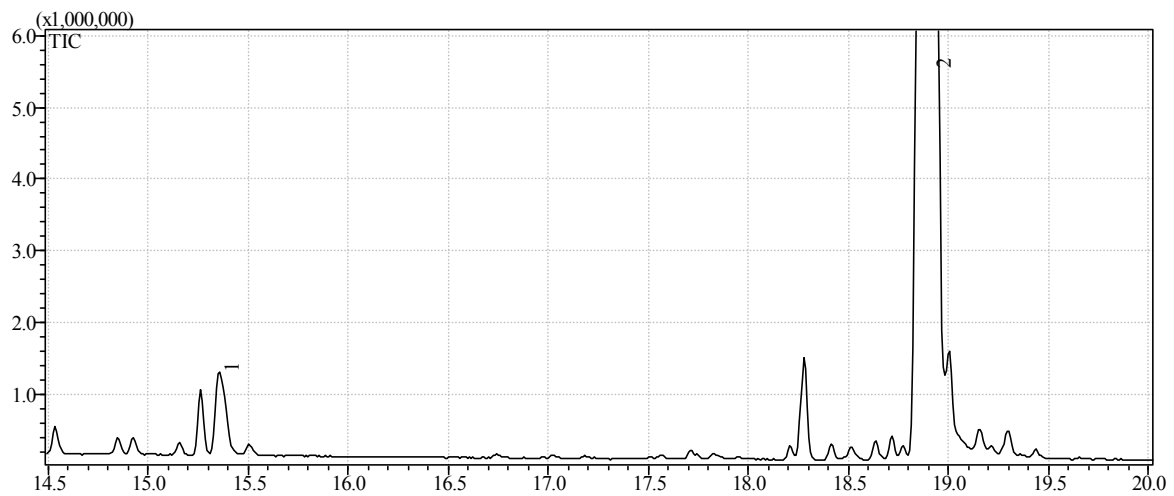
N.sua.BSMT2-1 + Nikotinsäure

Abbildung 6.5: N.sua.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Nikotinsäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Nikotinsäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Indol (peak 2).

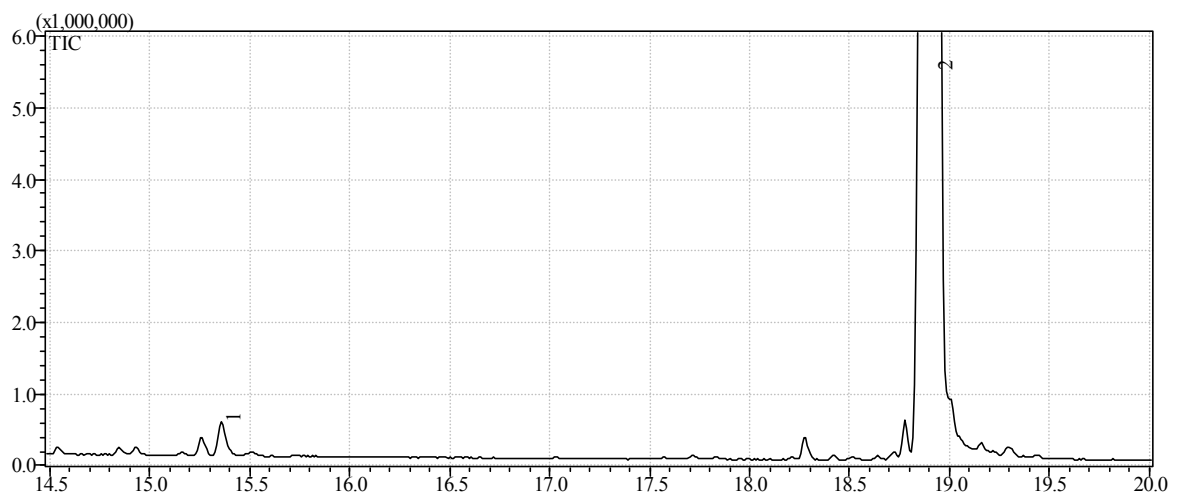
N.sua.BSMT2-1 Negativkontrolle

Abbildung 6.6: N.sua.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.

Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Indol (peak 2).

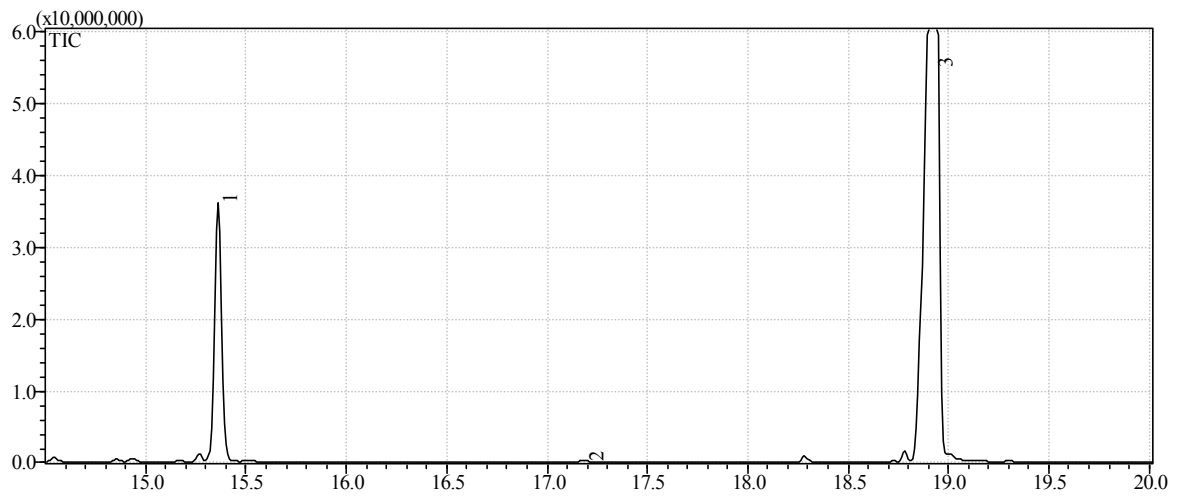
N.sua.SAMT1 + Benzoesäure

Abbildung 6.7: N.sua.SAMT1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Benzoesäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Indol (peak 3).

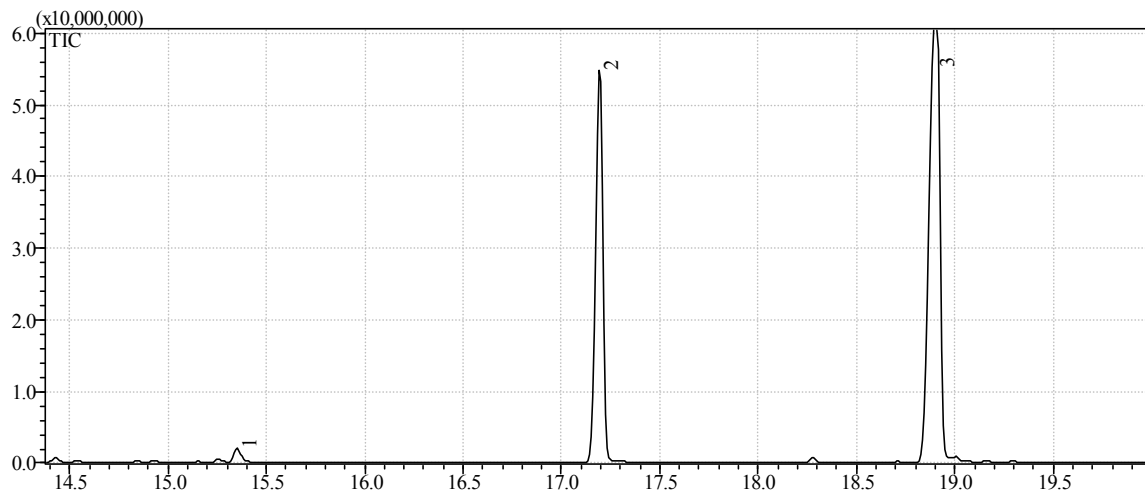
N.sua.SAMT1 + Salizylsäure

Abbildung 6.8: N.sua.SAMT1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Salizylsäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Indol (peak 3).

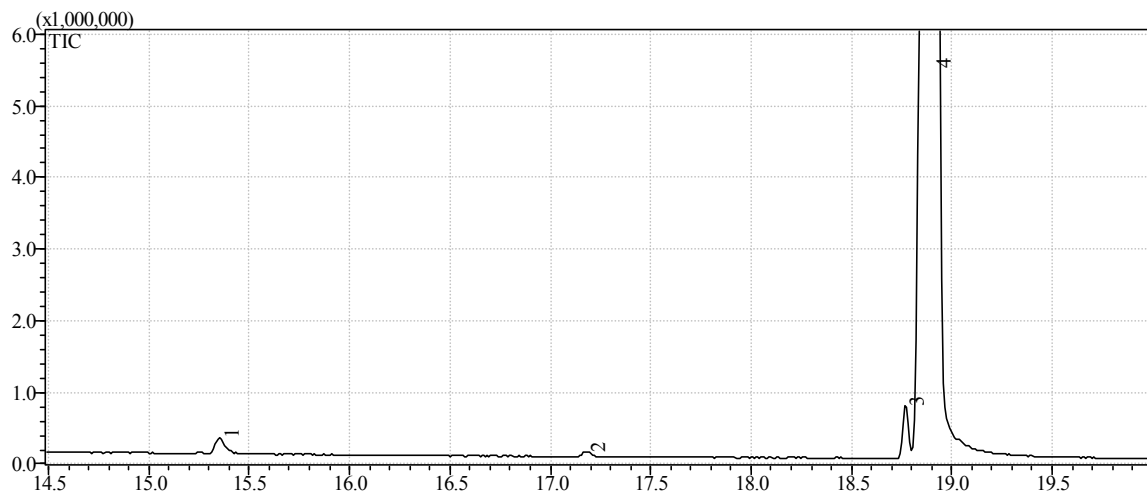
N.sua.SAMT1 Negativkontrolle

Abbildung 6.9: N.sua.SAMT1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.
Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Nonylacetat Standard 5ng (peak 3); Indol (peak 4).

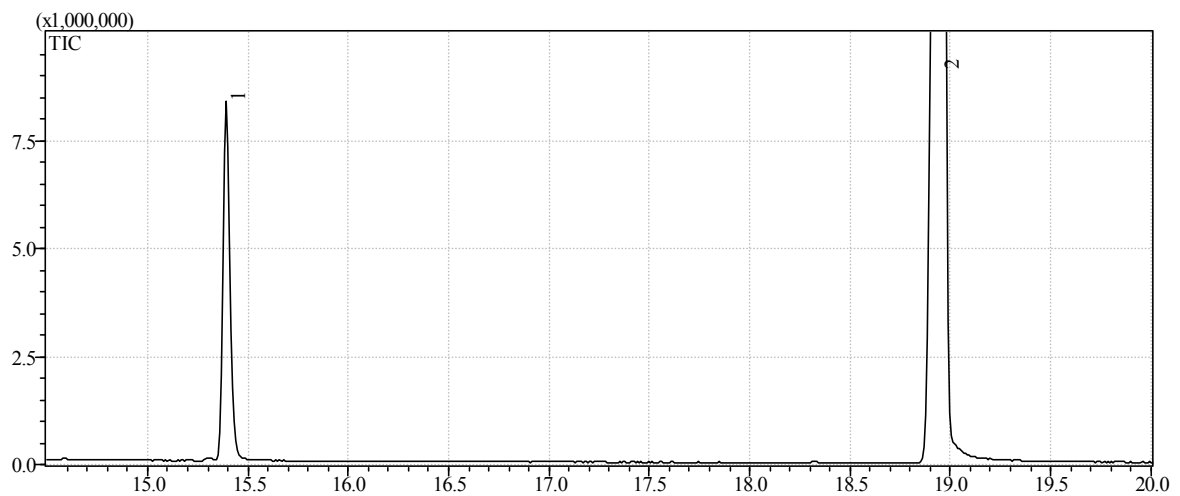
N.ala.BSMT2-1 + Benzoesäure

Abbildung 6.10: N.ala.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Benzoesäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Indol (peak 2).

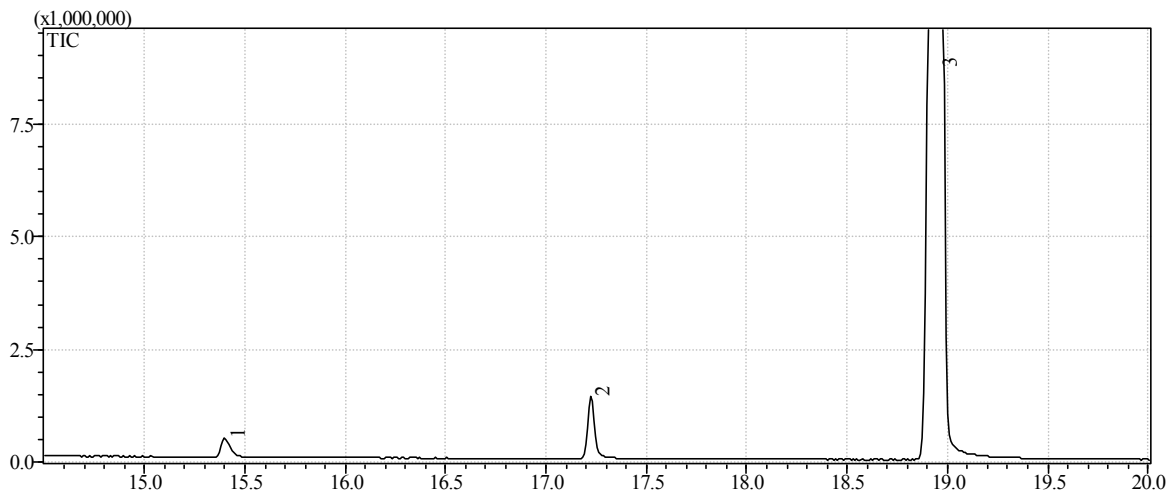
N.ala.BSMT2-1 + Salizylsäure

Abbildung 6.11: N.ala.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Salizylsäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Indol (peak 3).

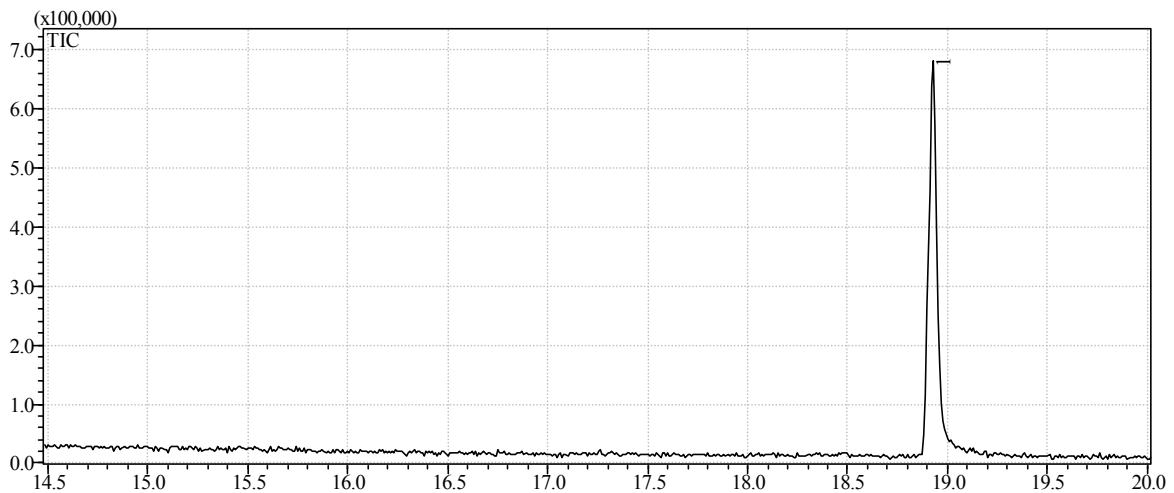
N.ala.BSMT2-1 + Nikotinsäure

Abbildung 6.12: N.ala.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Nikotinsäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Nikotinsäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Indol (peak 1).

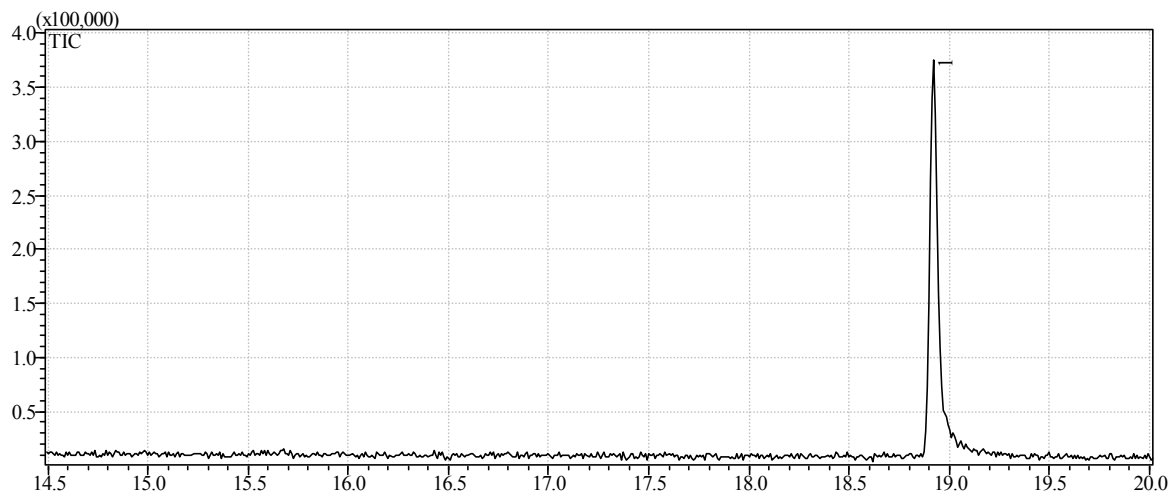
N.ala.BSMT2-1 Negativkontrolle

Abbildung 6.13: N.ala.BSMT2-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.

Identifizierte Verbindungen: Indol (peak 1).

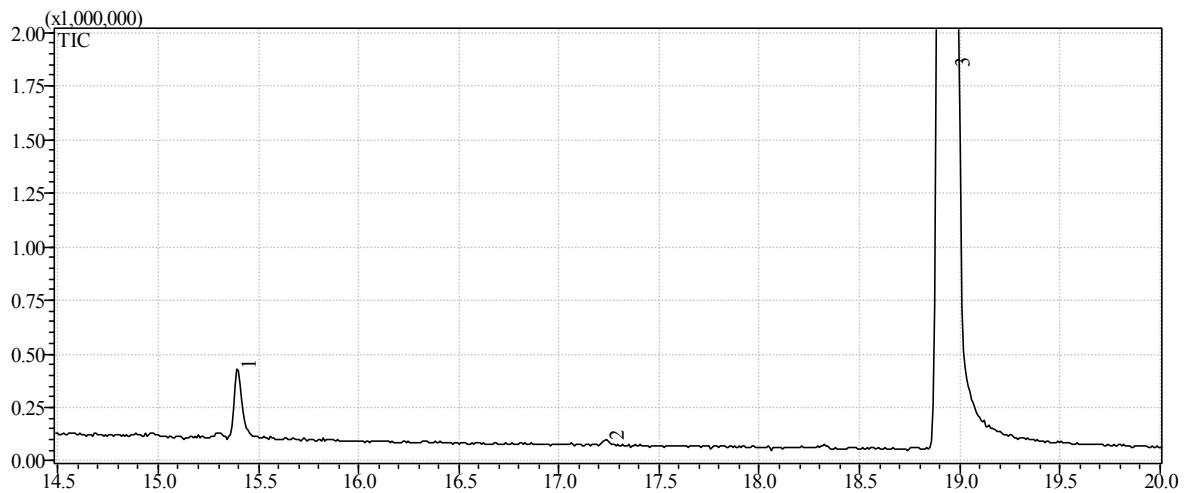
N.ala.SAMT1 + Benzoesäure

Abbildung 6.14: N.ala.SAMT1 im pET101/D-TOPO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Benzoesäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Indol (peak 3).

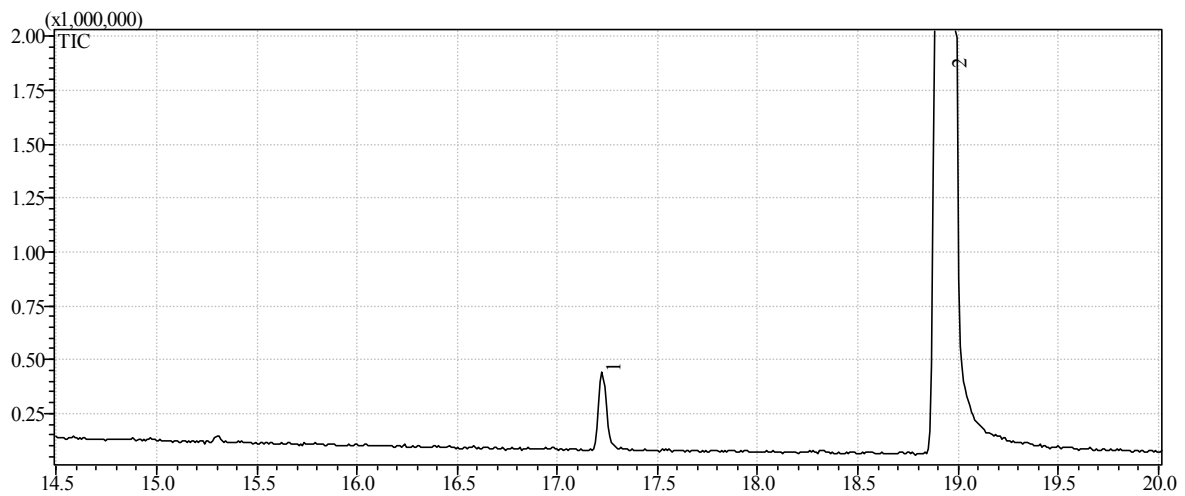
N.ala.SAMT1 Salizylsäure

Abbildung 6.15: N.ala.SAMT1 im pET101/D-TOPO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Salizylsäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylsalizylat (peak 1); Indol (peak 2).

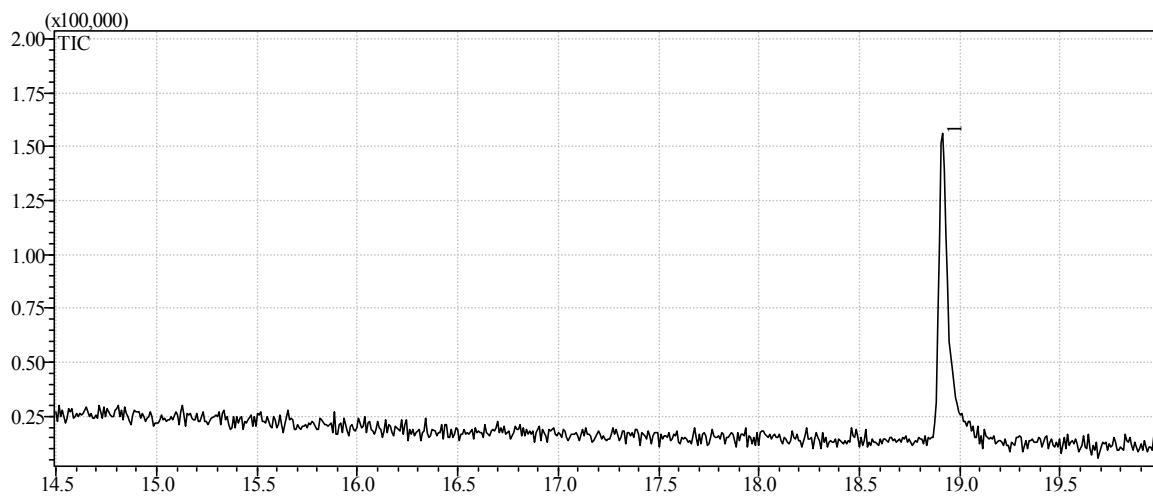
N.ala.SAMT1 Negativkontrolle

Abbildung 6.16: N.ala.SAMT1 im pET101/D-TOPO Vektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.

Identifizierte Verbindungen: Indol (peak 1).

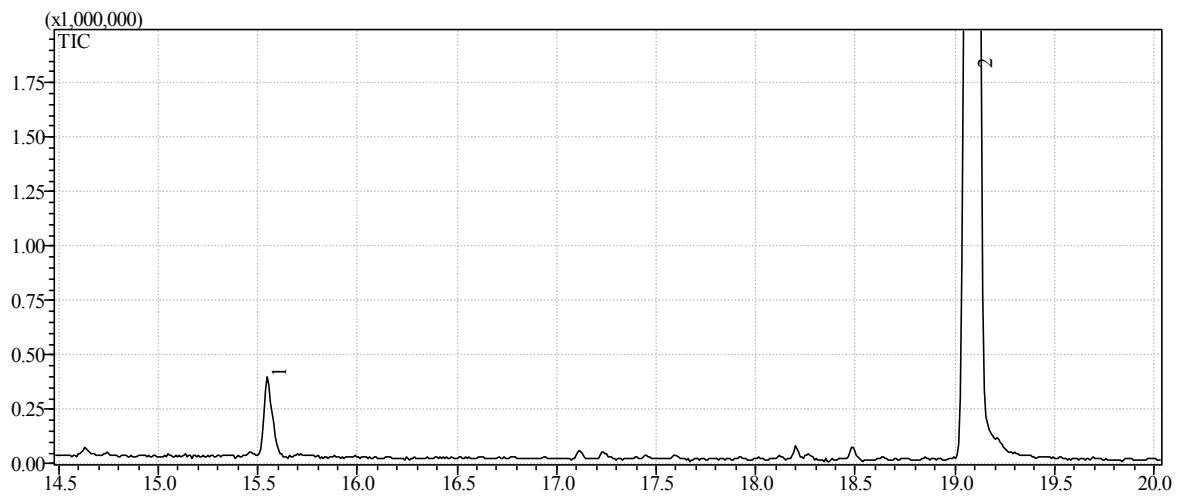
N.syl.BSMT2-1 + Benzoesäure

Abbildung 6.17: N.syl.BSMT2-1 im pET101/D-TOPO in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.
Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Benzoesäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Indol (peak 2).

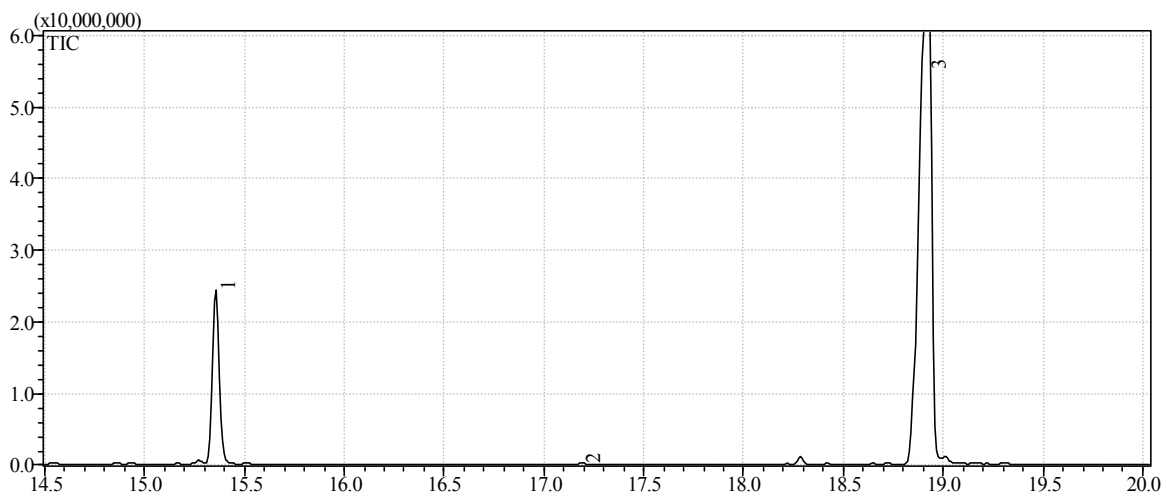
N.syl.SAMT1 + Benzoesäure

Abbildung 6.18: N.syl.SAMT1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Benzoesäure.
Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Benzoesäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Indol (peak 3).

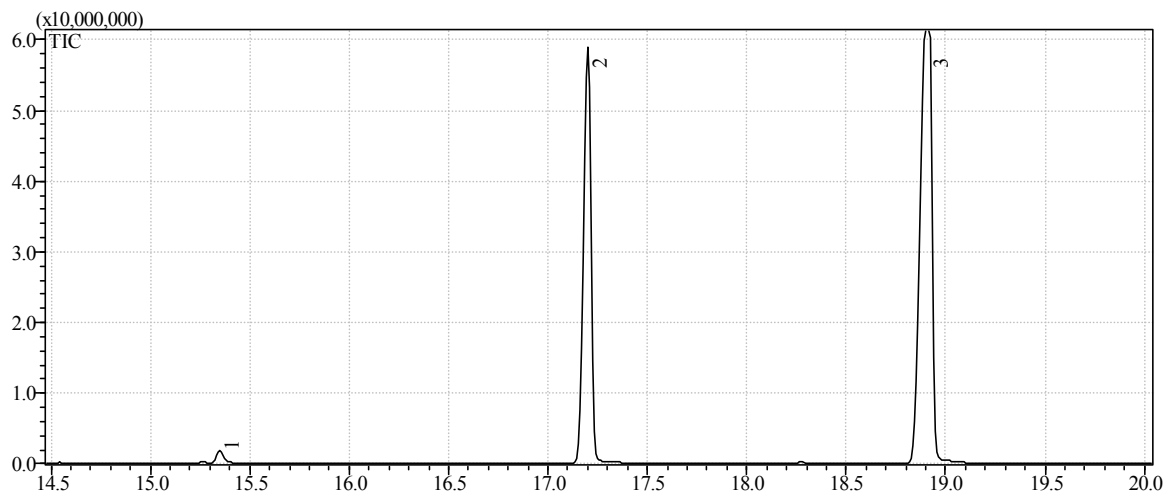
N.syl.SAMT1 + Salizylsäure

Abbildung 6.19: N.syl.SAMT1 im pET SUMOvektor in HMS174(DE3) Zellen mit Salizylsäure.
Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Salizylsäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Indol (peak 3).

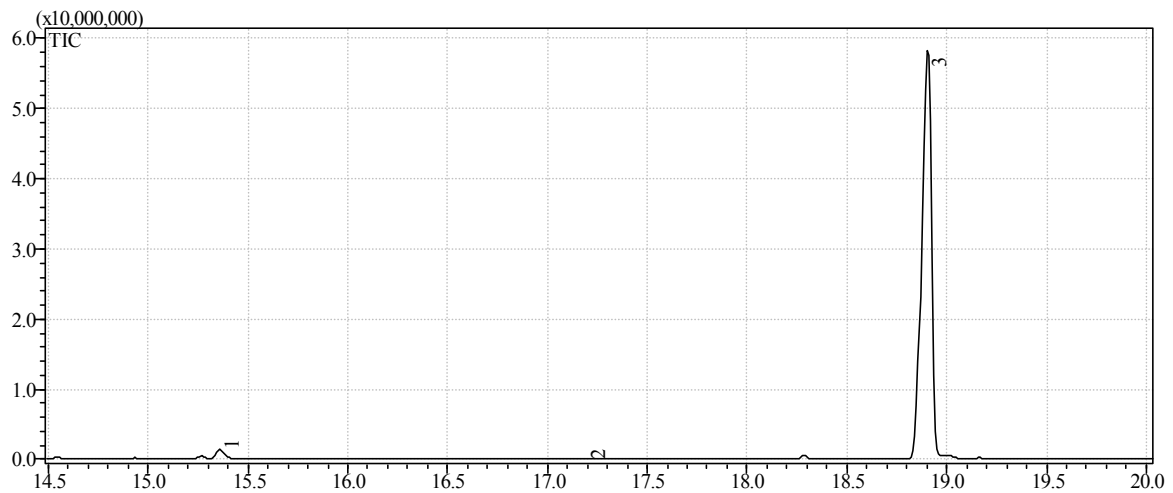
N.syl.SAMT1 Negativkontrolle

Abbildung 6.20: N.syl.SAMT1 im pET SUMOvektor in HMS174(DE3) Zellen ohne Substrat.
Identifizierte Verbindungen: Methylbenzoat (peak 1); Methylsalizylat (peak 2); Indol (peak 3).

N.gos.NAMT1-1 + Nikotinsäure

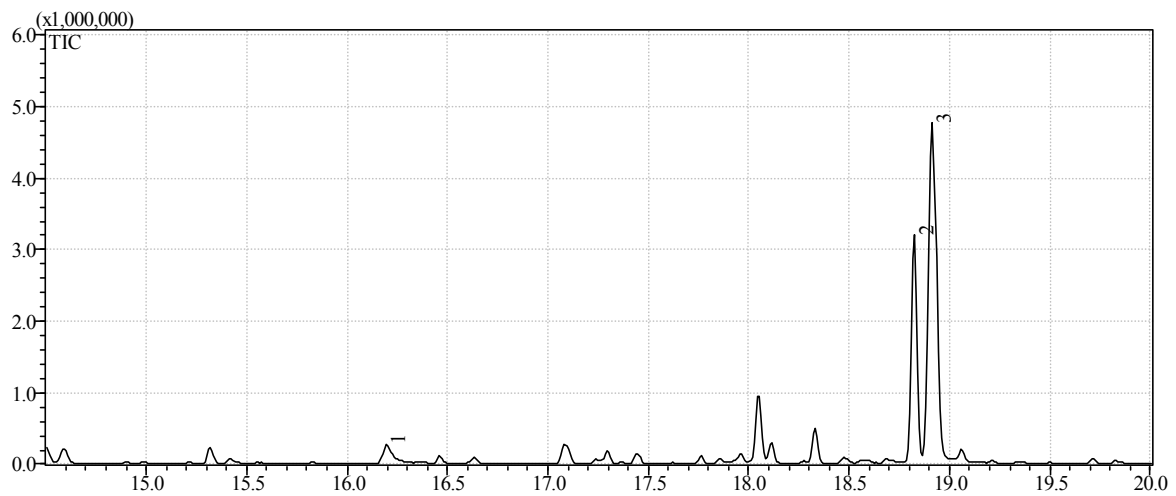


Abbildung 6.21: N.gos.NAMT1-1 im pET SUMO Vektor in HMS174(DE3) Zellen mit Nikotinsäure.

Zu den induzierten HMS174 (DE3) Zellen wurde 1 mM Nikotinsäure hinzugegeben. Identifizierte Verbindungen: Methylnikotinat (peak 1); n-Nonylacetat Standard 5 ng (peak 2); Indol (peak 3).

6.4.2 Messung von Blütenduft mittels GC-MS Analyse

6.4.2.1 Blütenduft *N. sylvestris*

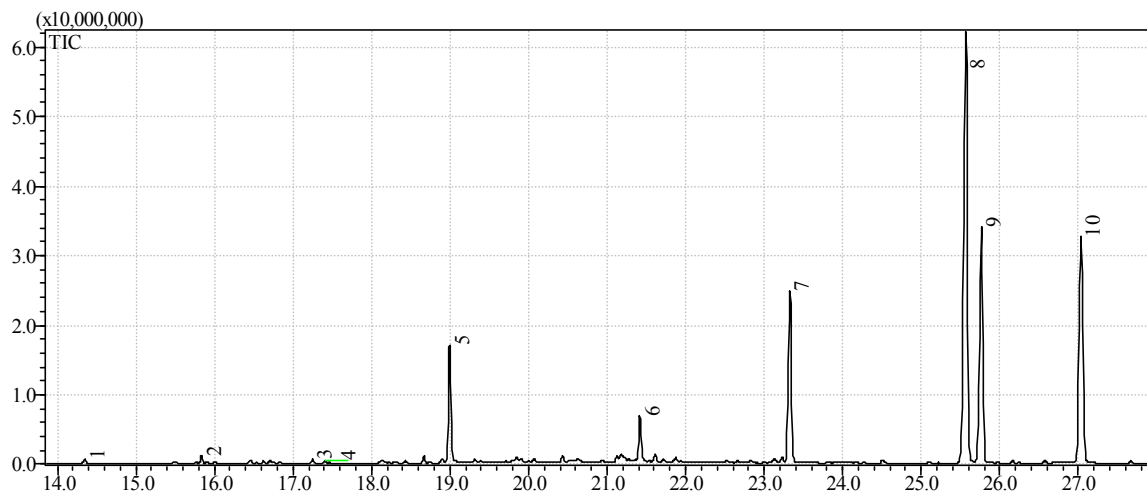


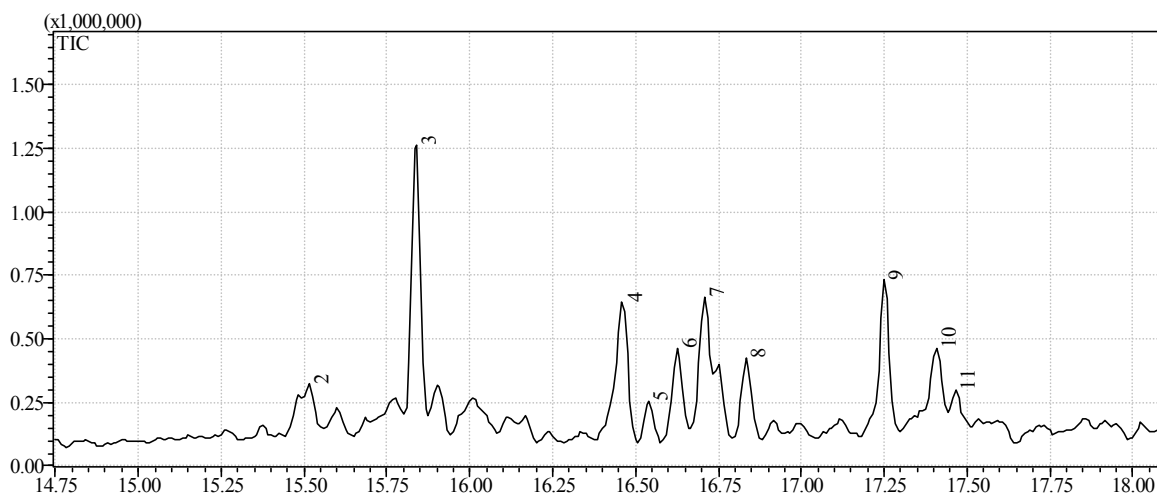
Abbildung 6.22: Blütenduft aus *N. sylvestris*.

Der Duft von vier Blüten wurde über die gesamte Blühzeit von drei Tagen aufgefangen und anschließend mittels GC-MS Analyse untersucht. Die nachgewiesenen Verbindungen sind in Tab. 6.3 beschrieben. Es konnte weder Methylsalizylat noch Methylbenzoat nachgewiesen werden.

Tabelle 6.3: Übersicht der im Blütenduft von *N. sylvestris* nachgewiesenen Verbindungen.

Es wurden vier Blüten über einen Zeitraum von 3 Tagen vermessen. Die Wahrscheinlichkeiten mit der es sich um die angegebene Verbindung handelt, ist angegeben.

peak	Retentionszeit	Substanz / Sicherheit in %
1	14,35	Benzylalkohol / 95 %
2	15,84	p-Trimethylsilyloxyphenyl-(trimethylsilyloxy)trimethylsilylacrylat / 78 %
3	17,25	n-Tridecan / 95 %
4	17,41	(+)-alpha-Terpineol (p-menth-1-en-8-ol) / 79 %
5	18,99	n-Nonanylacetat; Standard / 86 %
6	21,42	unbekannt
7	23,32	Methoxyeugenol / 94 %
8	25,57	Eugenol / 77%
9	25,74	Benzylbenzoat / 97 %
10	27,03	Salizylsäurebenzylester / 97%

**Abbildung 6.23: Blütenduft aus *N. sylvestris*.** (Ausschnitt aus Abbildung 6.22).

Der Duft von vier Blüten wurde über die gesamte Blühzeit von drei Tagen aufgefangen und anschließend mittels GC-MS Analyse untersucht. Die nachgewiesenen Verbindungen sind in Tab. 6.4 beschrieben. Es konnte weder Methylsalizylat noch Methylbenzoat nachgewiesen werden.

Tabelle 6.4: Übersicht der im Blütenduft von *N. sylvestris* nachgewiesenen Verbindungen. (Ausschnitt)

Es wurden vier Blüten über einen Zeitraum von 3 Tagen vermessen. Die Wahrscheinlichkeiten mit der es sich um die angegebene Verbindung handelt, ist angegeben.

peak	Retentionszeit	Substanz / Sicherheit in %
1	15,51	Ethyllinalool / 80 %
2	15,38	p-Trimethylsilyloxyphenyl-(trimethylsilyloxy)trimethylsilylacrylate / 78%
3	16,46	Octan, 3,4,5,6-tetramethyl- / 85 %
4	16,54	unbekannt
5	16,27	Methylformamid / 84 %
6	16,70	Benzylacetat / 92 %
7	16,83	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis- / 87%
8	17,25	n-Tridecan / 95 %
9	17,41	(+)-alpha-Terpineol (p-menth-1-en-8-ol) / 79 %
10	17,47	2,5-Dimethyloctan / 86 %

6.4.2.2 Blütenduft *N. alata*

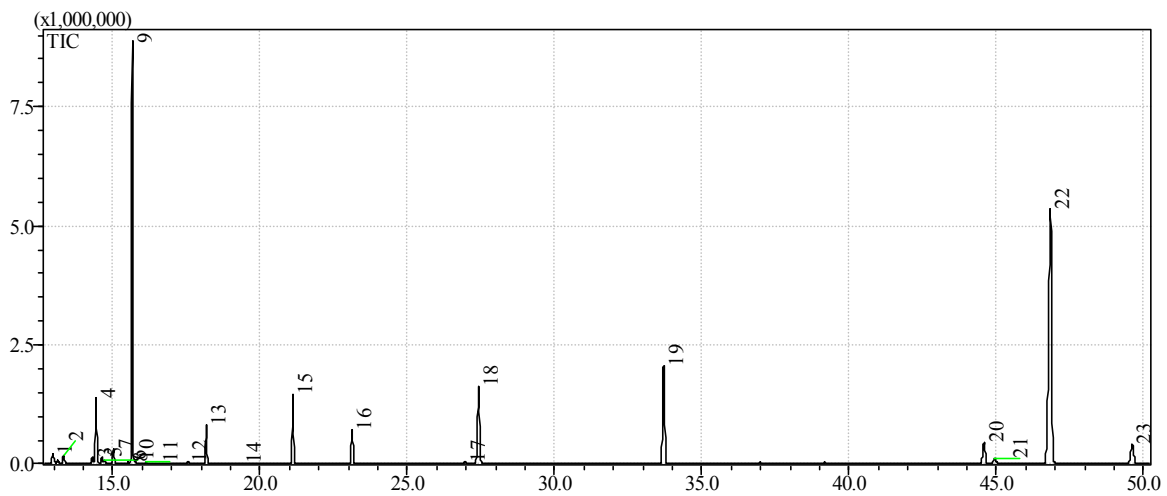


Abbildung 6.24: Blütenduft aus *N. alata*.

Der Duft von 2 zwei Tage alten Blüten wurde zwischen 23.30 Uhr und 01.30 Uhr aufgefangen und anschließend mittels GC-MS Analyse untersucht. Die nachgewiesenen Verbindungen sind in Tab. 6.5 beschrieben. Es konnte weder Methylsalizylat noch Methylbenzoat nachgewiesen werden.

Tabelle 6.5: Übersicht der im Blütenduft von *N. alata* nachgewiesenen Verbindungen.

Es wurden 2 zwei Tage alte Blüten über einen Zeitraum von 23.30 Uhr – 01.30 Uhr vermessen. Die Wahrscheinlichkeiten mit der es sich um die angegebene Verbindung handelt ist angegeben.

peak	Retentionszeit	Substanz / Sicherheit in %
1	12,95	Benzaldehyd / 89%
2	13,32	β -Myrcen / 86%
3	14,30	Limonen / 86 %
4	14,43	1,8-Cineol / 81 %
5	14,63	Benzeneacetaldehyd / 94%
6	14,72	Salizylaldehyd / 81%
7	15,02	Benzylalkohol / 86%
8	15,50	cis-Linaloloxid / 76%
9	15,66	Linalool / 87%
10	15,72	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-aminobenzoat / 82%
11	16,13	Phenylethylalkohol / 88%
12	17,55	Myrcenol / 83%
13	18,17	alpha.-Terpineol / 92%
14	19,37	6-Methyl-1,6-heptadien / 86%
15	21,11	Essigsäureheptylester / 91%
16	23,13	Eugenolacetat / 89%
17	26,97	unbekannt
18	27,42	Isoeugenol / 92%
19	33,71	Nerolidol / 89 %
20	44,59	(Z,E)-Farnesol / 83%
21	44,94	unbekannt
22	46,84	(E,E)-Farnesol / 89%
23	49,63	Benzylbenzoat / 87%

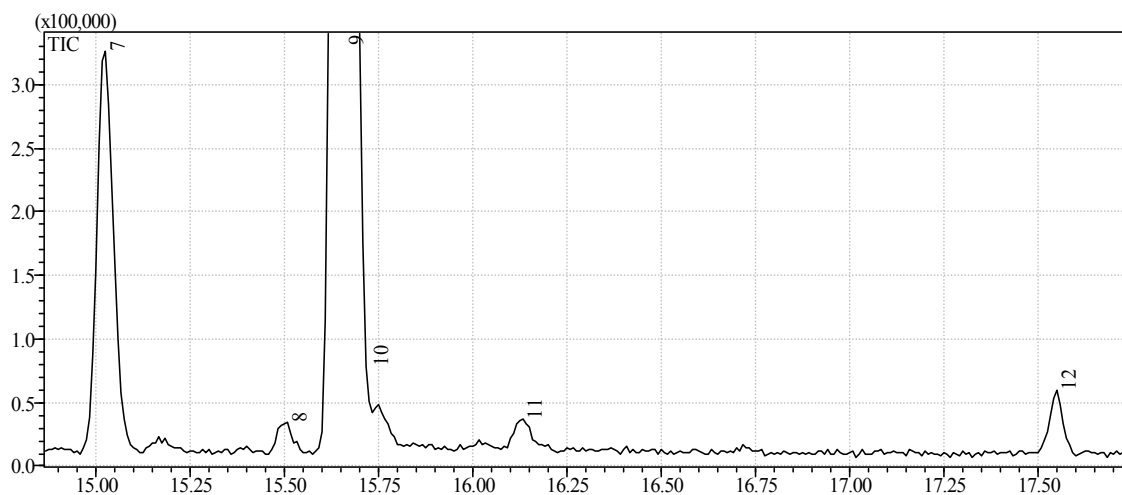


Abbildung 6.25: Blütenduft aus *N. alata*. (Ausschnitt aus Abbildung 6.24).

Der Duft von 2 zwei Tage alten Blüten wurde zwischen 23.30 Uhr und 01.30 Uhr aufgefangen und anschließend mittels GC-MS Analyse untersucht. Die nachgewiesenen Verbindungen sind in Tab. 6.6 beschrieben. Es konnte weder Methylsalizylat noch Methylbenzoat nachgewiesen werden.

Tabelle 6.6: Übersicht der im Blütenduft von *N. alata* nachgewiesenen Verbindungen. (Ausschnitt)

Es wurden 2 zwei Tage alte Blüten über einen Zeitraum von 23.30 – 01.30 Uhr vermessen. Die Wahrscheinlichkeiten mit der es sich um die angegebene Verbindung handelt, ist angegeben.

peak	Retentionszeit	Substanz / Sicherheit in %
7	15.02	Benzylalkohol / 86%
8	15.50	cis-Linaloloxid / 76%
9	15.66	Linalool / 87%
10	15.73	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-aminobenzoat / 82%
11	16.13	Phenylethylalkohol / 88%
12	17.55	Myrcenol / 83%