

Molekulare, physiologische und biochemische
Charakterisierung der Genfamilie für
4-Cumarat:Coenzym A Ligase
aus Sojabohne (*Glycine max* L.)

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christian Lindermayr
aus Friedberg

Mai 2002

Dekan: Prof. Dr. Wilfried Gabriel

Leiter der Arbeit: Prof. Dr. Jürgen Ebel

Referent: Prof. Dr. Jürgen Ebel

Koreferent: Prof. Dr. Hugo Scheer

Tag der Einreichung der Dissertation: 22. Mai 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2002

Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:

Lindermayr C., Möllers B., Fliegmann J., Uhlmann A., Lottspeich F., Meimberg H. and Ebel J. (2002) Divergent members of a soybean (*Glycine max L.*) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family: primary structures, catalytic properties, and differential expression. *Eur. J. Biochem.* 269, 1304-1315.

Lindermayr C., Fliegmann J. and Ebel J. (2002) Deletion of a single amino acid residue from different 4-coumarate:CoA ligases from soybean results in the generation of new substrate specificities. Manuskript eingereicht

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....		I
Abkürzungsverzeichnis		V
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....		VII
1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeine Phytopathologie	1
1.2	Das Pathosystem Sojabohne/ <i>Phytophthora sojae</i>	3
1.3	Phenylpropanstoffwechsel und nachfolgende Synthesewege	5
1.4	Die 4-Cumarat:Coenzym A Ligase (4CL)	10
1.5	Proteinstrukturanalyse	15
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2	Materialien und Methoden.....	17
2.1	Materialien.....	17
2.1.1	Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2	Geräte und Zubehör	18
2.1.3	Reaktionssysteme und Kits	18
2.1.4	Enzyme	19
2.1.5	Vektoren	19
2.1.6	Bakterienstämme	19
2.1.7	Computerprogramme.....	20
2.1.8	Verwendete Puffersysteme und Lösungen	21
2.1.9	Verwendete Medien	22
2.1.10	Oligonukleotide	23
2.1.11	Verwendete abgeleitete Aminosäuresequenzen	25
2.1.12	Genspezifische <i>Gm4CL</i> -Sonden für Northern-Hybridisierungen.....	26
2.1.13	Genspezifische <i>Gm4CL</i> -Sonden für Southern-Hybridisierungen.....	26
2.1.14	Verwendete cDNA-Plasmide	27
2.1.15	Pflanzenmaterial	28
2.1.16	<i>Phytophthora</i> -Kulturen	28
2.1.17	Elicitor.....	28
2.1.18	Antikörper	28
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Proteinbestimmung.....	28
2.2.2	Stammhaltung der Zellsuspensionskultur von Sojabohne (<i>Glycine max</i> L. cv. Harosoy 63)	29
2.2.3	Stammhaltung von <i>Phytophthora sojae</i>	29

2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.2.5	Proteintransfer und Immunodetektion	30
2.2.6	Aufarbeitung von Sojabohnenzellkulturen und Sojabohnengeweben.....	30
2.2.7	Direkter spektralphotometrischer Enzymtest	30
2.2.8	Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte der rekombinanten <i>Gm4CL</i> -Proteine.....	31
2.2.9	Abschätzung der Enzymaktivitäten von <i>Gm4CL1</i> , <i>Gm4CL2</i> und <i>Gm4CL3/4</i> für 4-Cumarsäure aus Protein-Rohextrakten.....	32
2.2.10	Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen aus Kulturstadium I und II.....	33
2.2.11	Gewinnung von Zoosporen von <i>Phytophthora sojae</i>	33
2.2.12	Anzucht von Sojabohnekeimlingen.....	33
2.2.13	Infektion von Sojabohnekeimlingen	34
2.2.14	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
2.2.15	Ligationsreaktion.....	35
2.2.16	Isolierung von Nukleinsäuren	35
2.2.16.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
2.2.16.2	Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen.....	36
2.2.16.3	Isolierung von genomischer DNA.....	36
2.2.16.4	Isolierung von Gesamt-RNA.....	37
2.2.16.5	Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA.....	37
2.2.17	Gelelektrophoretische Auftrennung, Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren.....	38
2.2.17.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA.....	38
2.2.17.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	38
2.2.17.3	Transfer von Nukleinsäuren	38
2.2.17.4	Übertragung bakterieller Nukleinsäuren auf Nitrocellulosemembran	39
2.2.18	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	39
2.2.19	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	40
2.2.20	DNA-Sequenzierung	40
2.2.21	Phylogenetische Analyse.....	40
2.2.22	Klonierung der <i>Gm4CL1</i> -cDNA	41
2.2.22.1	Ableitung von degenerierten Oligonukleotiden	41
2.2.22.2	Amplifizierung einer <i>Gm4CL1</i> -Sonde	43
2.2.22.3	Herstellung einer cDNA-Bank	44
2.2.22.4	Durchmustern einer cDNA-Bank.....	45
2.2.22.5	Synthese und Amplifikation von 5'-cDNA-Enden	45
2.2.23	Eliminierung des Startcodon der <i>Gm4CL1</i> und <i>Gm4CL4</i> und Ligation der modifizierten cDNA-Sequenzen in den Expressionsvektor pQE-30	46
2.2.24	Klonierung der <i>Gm4CL3</i> in den Expressionsvektor pQE-31.....	47
2.2.25	Herstellung elektrokompeter Bakterienzellen	47
2.2.26	Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen	48
2.2.27	Synthese von rekombinanten Proteinen in Bakterienzellen.....	48
2.2.28	Isolierung von Proteinen aus Bakterienzellen.....	49
2.2.29	Metallchelate-Affinitätschromatographie	49
2.2.30	Strukturanalysen.....	49

2.2.30.1	Struktur-Vorhersage	49
2.2.30.2	Hybrid-Bildung	50
2.2.30.3	<i>In-vitro</i> -Mutagenese mit PCR	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Molekulare und physiologische Charakterisierung der <i>Gm4CL</i> -Isoformen	54
3.1.2	Das experimentelle System zur Isolierung der <i>Gm4CL1</i> -cDNA	54
3.1.3	Klonierung eines <i>Gm4CL1</i> -Fragments	54
3.1.4	Isolierung der <i>Gm4CL1</i> -cDNA	55
3.1.5	Vervollständigung der <i>Gm4CL1</i> -cDNA	55
3.1.6	Vervollständigung der <i>Gm4CL4</i> -cDNA	56
3.1.7	Sequenzvergleiche der 4CL-Isoformen aus Sojabohne und anderen Pflanzen.....	56
3.1.8	Phylogenetische Analyse der 4CL	58
3.1.9	Verwandte Gene der Sojabohne 4CL-Isoformen in anderen Leguminosen.....	59
3.1.10	Genomische Organisation der Sojabohne-4CLs	60
3.1.11	Organspezifische Verteilung der <i>Gm4CL</i> -Isoformen in Sojabohnkeimlingen	62
3.1.12	Regulation der <i>Gm4CL</i> -Isoformen nach Elicitierung von Sojabohnzellkulturen	64
3.1.13	Expression der <i>Gm4CL</i> -Isoforme in Sojabohnekeimwurzeln nach Infektion mit <i>Phytophthora sojae</i> Rasse 1	67
3.2	Biochemische Charakterisierung der <i>Gm4CL</i> -Isoformen	68
3.2.1	Heterologe Expression der <i>Gm4CL</i> -cDNAs	68
3.2.2	Katalytische Eigenschaften der rekombinanten <i>Gm4CL1</i>	70
3.2.3	Katalytische Eigenschaften der rekombinanten <i>Gm4CL4</i>	70
3.2.4	Vervollständigung der katalytischen Daten der rekombinanten <i>Gm4CL2</i> und <i>Gm4CL3</i>	71
3.2.5	Identifizierung von Sequenzbereichen, die die Substratspezifität der 4CL bestimmen	72
3.2.6	Peptidmotive innerhalb der SdR, die möglicherweise an der Bindung der Zimtsäurederivate beteiligt sind	75
3.2.7	„Alaninscanning“-Mutagenese zweier möglicher Substratbindedomänen der <i>Gm4CL1</i>	80
3.2.8	Valin-Deletion im Motiv M6 von <i>Gm4CL2</i> und <i>Gm4CL3</i>	82
4	Diskussion	86
4.1	Die Genfamilie der 4-Cumarat:Coenzym A Ligase aus Sojabohne.....	86
4.2	Verwandtschaftsverhältnisse der 4CL.....	88
4.3	Regulatorische Funktion der 4CL	89
4.4	Mögliche physiologische Funktionen der 4CL-Isoformen in Sojabohne	91

4.5	Die Substratspezifität der 4CL wird durch den zentralen Sequenzbereich bestimmt	94
4.6	Die Motive M4 und M6 sind mögliche Substratbindemotive	95
4.7	Valin-Deletion im Motiv M6 ermöglicht den Sinapinsäure-Umsatz	98
4.8	Weitere mögliche Substratbindemotive	101
4.9	Ausblick	102
5	Zusammenfassung	103
6	Literaturverzeichnis	105
7	Anhang	117
A1	Zusammenstellung der verwendeten PCR-Programme	117
A2	Nukleotidsequenz der <i>Gm4CL1</i> -cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz ...	118
A3	Nukleotidsequenz der <i>Gm4CL4</i> -cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz ...	120
A4	Vergleich einiger 4CL-Aminosäuresequenzen	122
A5	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der <i>Gm4CL</i> -Isoformen von der Konzentration verschiedener Zimtsäurederivate	124
A6	Vergleich der Aminosäuresequenzen einiger 4CLs, PheA und Luciferase	129
A7	Vergleich von Aminosäuresequenzen einiger Adenylat-bindender Enzyme	131
A8	Mutation im GEICIRG-Motiv	133

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Acyl:CoA Synthetase
AL	Acetyl:CoA Ligase
AMP	5'-Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
ATP	5'-Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	Cinnamylalkoholdehydrogenase
CCR	Cinnamoyl-CoA-Reduktase
CCoA3H	Cumaroyl-CoA-3-Hydroxylase
CCoAOMT	Kaffeoyl-CoA- <i>O</i> -Methyltransferase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C3H	Cumarsäure-3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
4CbL	4-Chlorobenzoyl:CoA Ligase
4CL(s)	4-Cumarat:CoA Ligase(n)
CoA	Coenzym A
COMT	Kaffeoyl- <i>O</i> -Methyltransferase
cpm	Impluse pro Minute
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
cv.	Kultivar
d	Tag(e)
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
3,4-DMZ	3,4-Dimethoxyzimtsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	„expressed sequence tag(s)“
F5H	Ferulasäure-5-Hydroxylase
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalatosid
Kan	Kanamycin
kat	katal

kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
L.	Linné
Luc	Luciferase
l	Liter
M	Molarität
MAP-Kinase	„mitogen-activated protein“-Kinase
MCS	„multiple cloning site“
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger RNA“)
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NTR	nicht translatierte Region
n. u.	nicht umgesetzt
ORF	„open reading frame“
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCS	Peroxisomale CoA-Synthetase
pfu	„plaque forming unit(s)“
PhaL	Phenylacetyl:CoA Ligase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
Rt	Raumtemperatur
S	Siemens
s	Sekunde(n)
SdR	Substratspezifität-determinierende Region
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-2-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Enzymeinheit; μmol Substratumsatz pro Minute)
u. a.	und andere
üN	über Nacht
UDP	5'-Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V_{max}	maximale Katalysegeschwindigkeit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel.....	6
Abb. 2:	Darstellung der Bildung der Flavan-Grundstruktur am Beispiel der Naringenin-Synthese	7
Abb. 3:	Mögliche Wege zur Biosynthese von Lignin-Einheiten in Angiospermen.....	9
Abb. 4:	Reaktionsmechanismus der Zimsäureaktivierung durch 4-Cumarat:CoA Ligase	11
Abb. 5:	Ableitung der degenerierten Oligonukleotidsequenz für die Peptide <i>Gm4CL1-S1</i> (A), <i>Gm4CL1-S2</i> (B) und <i>Gm4CL1-S3</i> (C)	41
Abb. 6:	Schematische Darstellung der <i>Gm4CL1</i> - und <i>Gm4CL3</i> -cDNA in den jeweiligen Expressionsvektoren.....	50
Abb. 7:	Vorgehensweise bei der <i>in-vitro</i> -Mutagenese.....	53
Abb. 8:	Vergleich der abgeleiteten 4CL-Aminosäuresequenzen aus Sojabohne.....	57
Abb. 9:	Phylogenetische Analyse von 31 4CL-Proteinsequenzen.....	59
Abb. 10:	Vorkommen verschiedener 4CL-Isoformen innerhalb der Familie der Fabaceae	60
Abb. 11:	Kreuzhybridisierungstest mit den verschiedenen <i>Gm4CL</i> -Sonden.....	61
Abb. 12:	Southern-Blot Analyse von genomischer Sojabohne-DNA.....	62
Abb. 13:	Organspezifische Verteilung der 4CL in Sojabohnekeimlingen.....	63
Abb. 14:	Aktivitätsänderung der 4CL-Isoformen nach Elicitierung von Sojabohnezellkulturen des Wachstumsstadium I (A) und II (B).....	65
Abb. 15:	Differentielle Expression der 4CL-Gene nach Elicitierung von Sojabohnezellkulturen.....	66
Abb. 16:	Differentielle Expression der 4CL-Gene nach Infektion von Sojabohnekeimwurzeln mit <i>P. sojae</i>	67
Abb. 17:	Expressionskinetik der rekombinanten <i>Gm4CL1</i> und <i>Gm4CL3</i>	68
Abb. 18:	Western-Blot-Analyse der rekombinanten <i>Gm4CL</i> -Isoformen.....	69
Abb. 19:	<i>Gm4CL1/Gm4CL3</i> -Hybridproteine (H1-H9).....	73
Abb. 20:	Vergleich der SdR einiger 4CLs	76
Abb. 21:	Vergleich der Kristallstrukturen und der Aminosäuresequenzen der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase (PheA) aus <i>Brevibacterium brevis</i> , der Luciferase (Luc) aus <i>Photinus pyralis</i> und der vorhergesagten Molekülstruktur der <i>Gm4CL1</i>	77
Abb. 22:	Vergleich der SdR einiger 4CLs mit den homologen Regionen der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase (PheA) und der Luciferase (Luc).....	78
Abb. 23:	Vergleich der Substratbindetasche der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase (PheA) aus <i>Brevibacterium brevis</i> (A) mit der möglichen Substratbindetasche der <i>Gm4CL1</i> (B).....	79
Abb. 24:	„Alaninscanning“-Mutagenese der <i>Gm4CL1</i>	81
Abb. 25:	Immunologischer Nachweis der Produktion der verschiedenen <i>Gm4CL</i> -Valinmutanten	82

Abb. 26:	Schematische Darstellung der möglichen physiologischen Funktionen der verschiedenen Sojabohne-4CL-Isoformen	92
Abb. 27:	Mögliche Auswirkungen der Valin-Insertion in <i>Gm4CL1</i> (<i>Gm4CL1iV344</i>) bzw. Valin-Deletion bei <i>Gm4CL3</i> (<i>Gm4CL3dV367</i>) auf die Struktur der vom Sequenzmotiv M6 gebildeten Schleife der möglichen Substratbindetasche der jeweiligen <i>Gm4CL</i> -Isoform	100
Abb. 28:	Nukleotidsequenz der <i>Gm4CL1</i> -cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz...	118
Abb. 29:	Nukleotidsequenz der <i>Gm4CL4</i> -cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz...	120
Abb. 30:	Vergleich einiger 4CL-Aminosäuresequenzen	122
Abb. 31:	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration verschiedener Zimtsäurederivate für die rekombinanten <i>Gm4CL1</i> (A), <i>Gm4CL2</i> (B), <i>Gm4CL3</i> (C), <i>Gm4CL4</i> (D) <i>Gm4CL2dV345</i> (E) und <i>Gm4CL3dV367</i> (F) nach direkter Auftragung der Meßpunkte.....	124
Abb. 32:	Vergleich der Aminosäuresequenzen einiger 4CLs, PheA und Luciferase	129
Abb. 33:	Vergleich der Aminosäuresequenzen einiger Adenylat-bildenden Enzyme.....	131
Abb. 34:	Vergleich der Substratspezifitäten von <i>Gm4CL1/I393</i> und <i>Gm4CL1/R393</i>	133
Tab. 1:	Bisheriger Kenntnisstand über 4CL-Isoformen in Sojabohne	14
Tab. 2:	Zusammenstellung der verwendeten cDNA-Plasmide und Beschreibung der Insertionen.....	27
Tab. 3:	Schema zur Ermittlung der 4CL-Isoform-Aktivitäten für 4-Cumarsäure.....	32
Tab. 4:	Ermittlung der Multiplikationsfaktoren.....	32
Tab. 5:	Charakteristika und Sequenzvergleiche der 4CL-Isoformen aus Sojabohne	58
Tab. 6:	Aktivitäten der 4CL-Isoformen in verschiedenen Organen der Sojabohnepflanze	64
Tab. 7:	Kinetische Eigenschaften der rekombinanten Sojabohne-4CLs	71
Tab. 8:	Substratspezifitäten der <i>Gm4CL1/Gm4CL3</i> -Hybridenzyme (H1-H9).....	75
Tab. 9:	Vergleich der kinetischen Eigenschaften von <i>Gm4CL2dV345</i> und <i>Gm4CL3dV367</i> mit den Werten für die jeweiligen Wildtyp- <i>Gm4CLs</i>	83
Tab. 10:	Kinetische Eigenschaften der <i>Gm4CL2</i> -Mutanten bzgl. Sinapinsäure.....	84
Tab. 11:	PCR-Programme	117

1 Einleitung

Während ihres Lebens sind Pflanzen vielen abiotischen und biotischen Stressoren ausgesetzt. Biotischer Streß wird durch Viren, Bakterien, Pilze, Nematoden und Insekten ausgelöst, die die Pflanzen als Nährstoffquelle nutzen oder sich auf Kosten ihres Wirtes vermehren. Da Pflanzen vor diesen äußeren Bedrohungen nicht fliehen können, haben sie im Verlauf der Evolution effektive Mechanismen entwickelt, um sich gegen diese Feinde zu schützen. Allerdings versuchen die pathogenen Organismen die pflanzlichen Abwehrsysteme zu umgehen, um die Pflanzen als Nährstoffquelle bzw. Vermehrungsmaschinerie zu nutzen. Es herrscht daher ein ständiger Wettlauf zwischen Entwicklung neuer Abwehrmechanismen auf Seiten der Pflanzen und Entwicklung neuer Angriffstrategien auf Seiten der Krankheitserreger.

Kulturpflanzen sind einem besonders starken Druck der Angreifer ausgesetzt, da sie einerseits den schädigenden Organismen aufgrund der groß angelegten Monokulturen im Überfluß zur Verfügung stehen und da sie aufgrund eines züchtungsbedingten Verlusts an genetischer Variabilität eine weitaus höhere Anfälligkeit gegenüber vielen Krankheitserregern und Schädlingen zeigen als ihre ursprünglichen Wildformen. Die Pflanzenzüchtung ist daher bestrebt, die natürliche Resistenz der Kulturpflanzen zu fördern. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu identifizieren und auf biochemischer und genetischer Ebene zu analysieren. Durch die Veränderung der Abwehrreaktionen könnte eine verstärkte Resistenz erreicht werden. Denkbare Ansätze wären das Einführen oder Ausschalten von Genen, die für definierte Eigenschaften (z. B. Pathogenperzeption oder Detoxifikation von Pathogenitätsfaktoren) kodieren oder die Modifikation der Expression regulatorischer Gene. Außerdem könnten, basierend auf den stark zunehmenden Proteinstrukturdaten, Enzyme mit neuen katalytischen Fähigkeiten hergestellt werden, die zur Produktion von neuen und/oder wirksameren Abwehrstoffen eingesetzt werden könnten. Der Wettlauf zwischen Pflanze und Krankheitserreger würde somit zu einem Wettlauf zwischen Biotechniker und Krankheitserreger werden.

1.1 Allgemeine Phytopathologie

Damit eine Pflanze sich gegen einen Krankheitserreger effektiv wehren kann, ist es von großer Bedeutung, dessen Anwesenheit schnell zu erkennen. Dazu können einerseits Moleküle des Pathogens (exogene Elicitoren), andererseits auch wirtseigene Substanzen (endogene Elicitoren), die durch die Aktivität des Angreifers freigesetzt wurden, dienen (Ebel und Cosio, 1994). Proteine, Glykoproteine, Peptide, Oligosaccharide, Fettsäuren und deren Derivate wurden bisher als Substanzen identifiziert, die Abwehrreaktionen in Pflanzen

auslösen können. Diese hohe strukturelle Diversität der Elicitoren zeigt, daß kein universeller Elicitor existiert, der als generelles Signal für eine Pathogen-Attacke dient, sondern, daß sich im Verlauf der Evolution fast in jedem Wirt-Pathogen-System spezifische Signalstoffe entwickelt haben (Ebel und Cosio, 1994; Ebel und Scheel, 1997).

Die Induktion der Pflanzenabwehr erfordert die Erkennung eines exogenen oder endogenen Elicitors, die in Pflanzen ähnlich wie im tierischen System vermutlich über (meist plasmamembranständige) Rezeptoren erfolgt. Bisher wurden einige Rezeptor-ähnliche Bindeproteine in Pflanzen identifiziert, deren Eigenschaften (hochaffine, saturierbare, reversible und strukturspezifische Ligandenbindung) für eine Beteiligung an der Signalperzeption sprechen (Bent, 1996; Ebel und Mithöfer, 1998; Ellis et al., 2000; Jones, 2001). Neben der „Erkennung“ des Pathogen ist die Aktivierung des intrazellulären Signalweges eine weitere wichtige Funktion eines Rezeptorproteins.

Die Hauptbestandteile der intrazellulären Signaltransduktion in Pflanzen scheinen neben Ionenflüssen über die Plasmamembran Ca^{2+} -abhängige Prozesse und Phosphorylierungsreaktionen zu sein. Innerhalb weniger Minuten nach Elicitor-Zugabe konnte in einigen pflanzlichen Zellkulturen ein Ca^{2+} -Einstrom, Cl^- - und K^+ -Ausstrom sowie eine Alkalisierung des Zellkulturmediums gemessen werden (z. B. Bach et al., 1993; Felix et al., 1993; Ebel et al., 1995; Jabs et al., 1997; Mithöfer et al., 1999). Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel könnte Ca^{2+} -abhängige Signalkomponenten wie z. B. Phosphoinositid-Zyklus, Calmodulin, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Ionentransporter und Lipasen aktivieren, die in Pflanzenzellen vorhanden zu sein scheinen (Bush, 1993; Drobak, 1993; Yotsushima et al., 1993; Renelt et al., 1993; Romeis et al., 2000). Änderungen im Phosphorylierungsgrad zellulärer Proteine wurden bereits in verschiedenen pflanzlichen Zellkulturen nach Elicitorbehandlung beobachtet (Boller, 1995; Ebel und Scheel, 1997). Eine „mitogen-activated protein“ (MAP) Kinase-Kaskade scheint die Signalweiterleitung über mehrere Phosphorylierungsreaktionen durchzuführen und vermutlich auch für die Aktivierung von Abwehrgenen verantwortlich zu sein, da MAP-Kinasen in ihrer aktivierten Form im Zellkern lokalisiert werden können (Ligterink, 1997; Asai, 2002). Außerdem scheinen aktive Sauerstoffprodukte, die während des „oxidative burst“ gebildet werden, unabhängig von Phosphorylierungskaskaden und Ionenflüssen, Gene zur Pathogenabwehr und zum Eigenschutz vor den aktiven Sauerstoffspezies zu aktivieren (Lamb und Dixon, 1997; Dangl und Jones, 2001; Mithöfer et al., 2001). Weitere Komponenten, die an einer intra- und interzellulären Signalweiterleitung beteiligt sein könnten sind Ethylen, Methyljasmonsäure, Jasmonsäure, Salicylsäure, Systemin, Lipidperoxide und Stickoxide (Nürnberger und Scheel, 2001; Dangl und Jones, 2001).

Die Abwehrmechanismen der Pflanzen können in präformierte Barrieren und induzierbare Abwehrreaktionen eingeteilt werden. Zu den präformierten Barrieren zählt die Oberflächenbeschaffenheit der Pflanze (z. B. Rhizodermis, Borke, Kutikula, Form und Anzahl der Stomata, Behaarung, etc.) und konstitutiv gebildete Abwehrstoffe

(Phenolderivate, Saponine, cyanogene Glykoside, Stilbene, Schwefelverbindungen, hydrolytische Enzyme, Enzyminhibitoren, etc.) (Elstner et al., 1996). Zu den induzierbaren Abwehrmechanismen wird die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies („oxidative burst“), die Synthese von PR-Proteinen, die Anreicherung von Phytoalexinen und die Verstärkung der Zellwände gerechnet.

Die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (z. B. Wasserstoffperoxid, Superoxidationen, Hydroxyl-Radikale) gehört zu den schnellen Abwehrantworten nach einem Pathogenbefall, da sie nicht auf die Neusynthese von Proteinen angewiesen ist (Ebel und Scheel, 1992). Diese Substanzen sind wahrscheinlich für das Absterben wirtseigener Zellen im Bereich des Infektionsortes verantwortlich (Hypersensitive Reaktion), um eine Pathogenausbreitung zu verhindern bzw. auf dieses nekrotische Areal zu beschränken. Außerdem können durch den Zelltod Stoffe aus der Vakuole freigesetzt werden, die auf den Erreger toxisch wirken (Knogge und Scheel, 1992). Durch oxidatives Quervernetzen von Zellwandproteinen wirken die reaktiven Sauerstoffspezies zudem an der Verstärkung der Zellwände mit (Brisson et al., 1994).

Nach Pathogenbefall werden neben Enzymen, die an der Synthese von Abwehrstoffen oder an der Zellwandstabilisierung beteiligt sind, auch Proteine gebildet, die direkt am Erreger wirken. Dazu zählen z. B. Zellwand-abbauende Enzyme (z. B. Chitinasen, Glucanasen), Proteinasen, Proteinase-Inhibitoren und Wachstums-hemmende Proteine (Elstner et al., 1996). Innerhalb aller induzierbaren Abwehrmechanismen scheint jedoch vor allem der Akkumulation von Phytoalexinen eine große Bedeutung zuzukommen (Ebel, 1998). Phytoalexine werden als niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Verbindungen definiert, die von den Wirtspflanzen synthetisiert werden und innerhalb bestimmter Wirtszellen akkumulieren, nachdem der Wirt mit Mikroorganismen in Kontakt gekommen ist (Keen et al., 1972). Vertreter der Phytoalexine finden sich in den unterschiedlichsten chemischen Stoffgruppen, wie z. B. Terpenoiden, Phenylpropanoiden oder Alkaloiden (Dixon, 2001). Obwohl ihre toxische Wirkung gegenüber Mikroorganismen in vielen Fällen beschrieben ist, sind die genauen Wirkorte und Wirkungsmechanismen der Phytoalexine noch weitgehend unbekannt. Als wichtiger Angriffspunkt werden die prokaryontische und eukaryontische Zellmembran vermutet (Elstner et al., 1996).

1.2 Das Pathosystem Sojabohne/*Phytophthora sojae*

Das Ursprungsgebiet der Sojabohne (*Glycine max* L.) liegt im nordöstlichen Asien, wo sie seit ca. 1000 v. Chr. angebaut wird. Mittlerweile gehört die Sojabohne zu den wichtigsten Nutzpflanzen der Welt. Die Hauptproduzenten sind heute USA, Brasilien und China. Die vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten von Sojabohne beruhen vor allem auf dem hohen Gehalt an Fett (15-20%) und Eiweiß (30-50%) ihrer Samen.

Phytophthora sojae (früher *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, Pmg), der Erreger der Wurzel- und Stengelfäule an Sojabohne, ist ein weitverbreitetes Pathogen in den Hauptanbaugebieten Nordamerikas, das bevorzugt Wurzeln junger Sojabohnekeimlinge durch asexuell entstandene Zoosporen infiziert. Innerhalb der Klasse der Oomyceten gehört er zur Ordnung der Pythiales. Die Oomyceten sind, wie auch die Goldalgen (Chrysophyceen), Kieselalgen (Bacillariophyta) und Braunalgen (Phaeophyceen), Vertreter der Abteilung der Stramenopiles, die dem Reich der Chromista zugeordnet werden. Es wurden bereits mehrere physiologische Rassen des Erregers beschrieben, die sich in der Virulenz gegenüber verschiedenen Kultivaren der Sojabohne unterscheiden (Ebel und Grisebach, 1988). Detaillierte Analysen existieren über die Interaktionen zwischen dem Sojabohnenkultivar Harosoy 63 und den *Phytophthora*-Rassen 1 (inkompatible Interaktion) und 3 (kompatible Interaktion). Werden Sojabohnekeimwurzeln mit der Rasse 1 bzw. 3 infiziert, zeigt sich bereits nach wenigen Tagen ein sichtbarer Unterschied im Infektionsverlauf. Bei Infektion mit Rasse 3 dringt das Pathogen schnell in tiefere Wurzelschichten vor. Noch bevor sich Sekundärwurzeln ausbilden können, stirbt zuerst die Primärwurzel und dann der gesamte Keimling ab (Hahn et al., 1985). Im Falle der Infektion mit Rasse 1 kommt es zur hypersensitiven Reaktion der Pflanze. Dadurch wird das Wachstum des Oomyceten auf äußere Zellschichten der Keimwurzeln beschränkt. Bevor im weiteren Verlauf der Infektion auch hier die Primärwurzel abstirbt, kommt es zur Ausbildung von Sekundärwurzeln, die eine weitere Versorgung des Keimlings gewährleisten (Hahn et al., 1985).

Die Resistenz der Sojabohne gegenüber Rasse 1 von *P. sojae* ist auf die Erkennung des Pathogens und die rasche Induktion von Abwehrmechanismen zurückzuführen. Als Elicitoren wurden 1,3-1,6- β -Glucane aus der Zellwand des Oomyceten identifiziert, von denen ein Hepta- β -glucosid die aktivste Einheit darstellt (Sharp et al., 1984a und b). Für die Perzeption des Elicitors in Sojabohne ist vermutlich ein membrangebundener Proteinkomplex aus zwei identischen 75 kDa-Proteinen und einem 100 kDa-Protein verantwortlich (Cosio et al., 1992; Mithöfer et al., 1996), wobei die Glucan-Bindung am 75-kDa Protein stattfindet und das 100 kDa-Protein wahrscheinlich den gesamten Rezeptorkomplex in der Membran verankert (Mithöfer et al., 2000).

Untersuchungen zur Signalweiterleitung und zur Produktion von Abwehrstoffen wurden hauptsächlich an Sojabohnenzellkulturen durchgeführt. Suspensionskulturen eignen sich für derartige Analysen besonders gut, da sich die Zellen im nahezu gleichen physiologischen Zustand befinden und da sie auf äußere Reize annähernd synchron reagieren. In Sojabohnenzellkulturen des Kultivars Harosoy 63 ist die Fähigkeit zur Induktion von Abwehrreaktionen, wie sie in infizierten Sojabohnekeimlingen beobachtet werden kann, erhalten geblieben (Ebel et al., 1976). Während des Wachstums der Suspensionskulturen können zwei Phasen mit erhöhter Reaktionsbereitschaft der Zellen beobachtet werden (Hille et al., 1982). Einerseits einen Tag nach Umsetzen der Zellen in neues Medium (Stadium I), andererseits kurz vor Erreichen der stationären Phase (Stadium II). Durch Behandlung der

Sojabohnenzellen mit Rohelicitor, der durch partielle Säurehydrolyse aus Zellwänden von *P. sojae* Rasse 1 gewonnen wurde, wurde die natürliche Infektion simuliert. Bereits wenige Minuten nach Elicitorzugabe konnte ein biphasischer Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, eine Alkalisierung des Zellkulturmediums (Ebel et al., 1995, Mithöfer et al., 1999) sowie eine Depolarisation und Cl^- -Flüsse (A. Mithöfer, unveröffentlicht) gemessen werden. Ferner scheinen an der Signalweiterleitung und eventuell auch an der transkriptionellen Aktivierung von Abwehrgenen Phosphorylierungsreaktionen beteiligt zu sein. Elicitor-aktivierbare MAP-Kinasen (A. Daxberger, unveröffentlicht) und eine Serin-Protein-Kinase (Dröge-Laser et al., 1997) konnten in Sojabohne bereits identifiziert werden. Außerdem konnte nach Elicitor-Behandlung von Sojabohnenzellkulturen H_2O_2 -Produktion wahrscheinlich durch eine NAD(P)H-abhängige Oxidase gemessen werden (Mithöfer et al., 1997). Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies sind nicht an der Aktivierung von Enzymen der Phytoalexinbiosynthese beteiligt (Mithöfer et al., 1997 und 2001), sondern haben ihre Funktion vermutlich in der Stabilisierung der Zellwände und der Peroxidation von Lipiden (Mehdy, 1994). Neben der Synthese reaktiver Sauerstoffspezies stellen die Auflagerung von Kallose (Bonhoff et al., 1987) und vor allem die Anreicherung von Glyceollinen, den typischen Phytoalexinen der Sojabohne, weitere wichtige Abwehrreaktionen dar. An der Biosynthese der Glyceolline sind ungefähr 15 Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels, der Flavonoid-/Isoflavonoidbiosynthese und des Pterocarpanstoffwechsels beteiligt (Ebel, 1998). Bisher wurden in Sojabohne fünf Glyceollinisomere identifiziert, wobei mengenmäßig das Isomer I bei der Pathogenabwehr dominiert.

1.3 Phenylpropanstoffwechsel und nachfolgende Synthesewege

Phenolverbindungen bilden neben Isoprenoiden die zweite große Gruppe innerhalb der sekundären Pflanzenstoffe. Gefäßpflanzen haben die Fähigkeit, große Mengen an Kohlenstoff vom Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren in die Biosynthese von Phenylpropanoiden zu lenken (Abb. 1). Die Bedeutung des Phenylpropanstoffwechsels zeigt sich in der Bereitstellung von Ausgangsstoffen zur Synthese von (Iso-)Flavonoiden, Lignin, Lignanen, Cumarinen, Suberin, Stilbenen, Phenolcarbonsäuren etc. (Knogge und Scheel, 1992; Douglas, 1996), die in Pflanzen z. B. als Transpirationsschutz, Zellwandstabilisatoren, Farbpigmente, Signalstoffe, Antioxidantien und als Schutzsubstanzen gegen Pathogene und Fraßfeinde Verwendung finden (Ebel et al., 1984; Richter, 1988; Dharmatilake und Bauer, 1992; Dixon und Paiva, 1995). Synthetisiert werden Phenylpropanoide im Verlauf der Pflanzenentwicklung in spezifischen Geweben oder ihre Produktion wird durch äußere Reize wie z. B. Verwundung, Pathogenbefall oder UV-Strahlung induziert (Hahlbrock und Scheel, 1989; Dixon und Paiva, 1995).

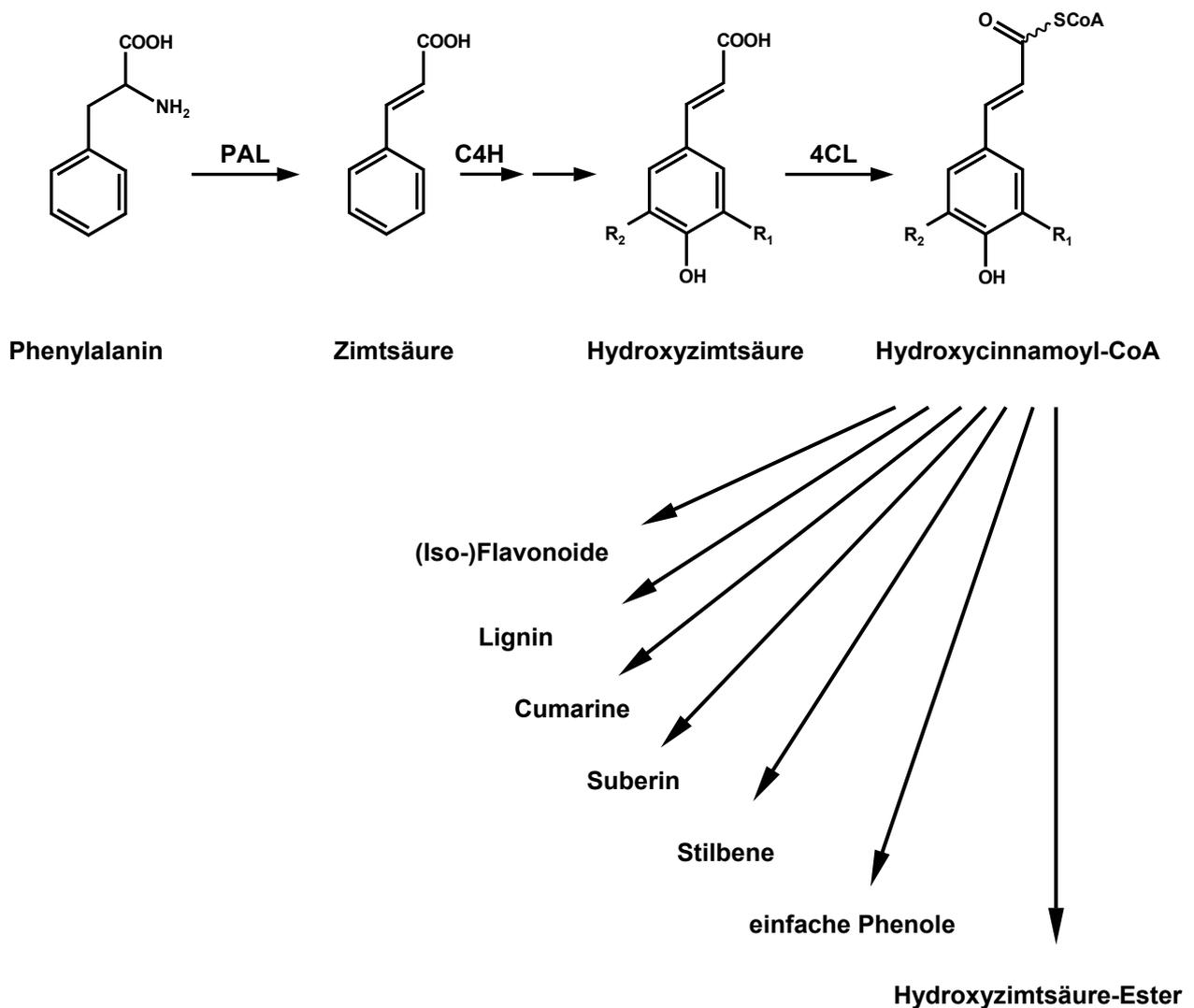


Abb. 1: Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel.

Der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel dient der Bereitstellung energiereicher Coenzym A-Thioester substituiertes Zimtsäuren, die wiederum Substrate für strukturell und funktionell sehr unterschiedliche Phenylpropanderivate sind. PAL: Phenylalanin-Ammonium-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-Hydroxylase, 4CL: 4-Cumarat:CoA Ligase.

4-Cumarsäure: $R_1=R_2=H$; Kaffeesäure: $R_1=OH, R_2=H$; Ferulasäure: $R_1=OCH_3, R_2=H$; Sinapinsäure: $R_1=R_2=OCH_3$; 3,4-Dimethoxyzimtsäure: $R_1=OCH_3, R_2=H$.

Die Synthese der Phenylpropanoide beginnt mit der Herstellung von Zimtsäure durch die Desaminierung von Phenylalanin. Dieser erste Schritt stellt den Übergang vom Shikimat-Weg (Primär-Metabolismus) zum Phenylpropanstoffwechsel (Sekundär-Metabolismus) dar und wird von der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysiert. Durch die Aktivität von Hydroxylasen (Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H), Zimtsäure-3-Hydroxylase (C3H) und Ferulasäure-5-Hydroxylase (F5H)) und *O*-Methyltransferasen (COMT) werden unterschiedliche Substitutionen am Phenylring der Zimtsäure durchgeführt, die zur Bildung von 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure führen. Das Enzym 4-

Cumarat:CoA Ligase (4CL) katalysiert die Bildung der CoA-Ester der Zimtsäurederivate. Diese aktivierten Zwischenprodukte gehen in die spezifischen Synthesewege der verschiedenen Phenylpropanabkömmlinge ein. Allerdings sind mit der Aktivierung der Phenylpropanoide die Modifikationen am Phenylring noch keineswegs abgeschlossen. Durch die Aktivität von Hydroxylasen und *O*-Methyltransferasen können noch weitere Substitutionen durchgeführt werden.

Lignin und (Iso-)Flavonoide sind wohl die bedeutendsten pflanzlichen Produkte, für deren Synthese Phenylpropanoide benötigt werden. Bei der Biosynthese des Flavangerüsts - der Grundstruktur der (Iso-)Flavonoide - stammt der Ring B und die C-Atome 2, 3 und 4 des Heterozyklus von aktivierten Zimtsäurederivaten, während der Ring A aus drei Acetat-Einheiten (Malonyl-CoA) gebildet wird (Abb. 2).

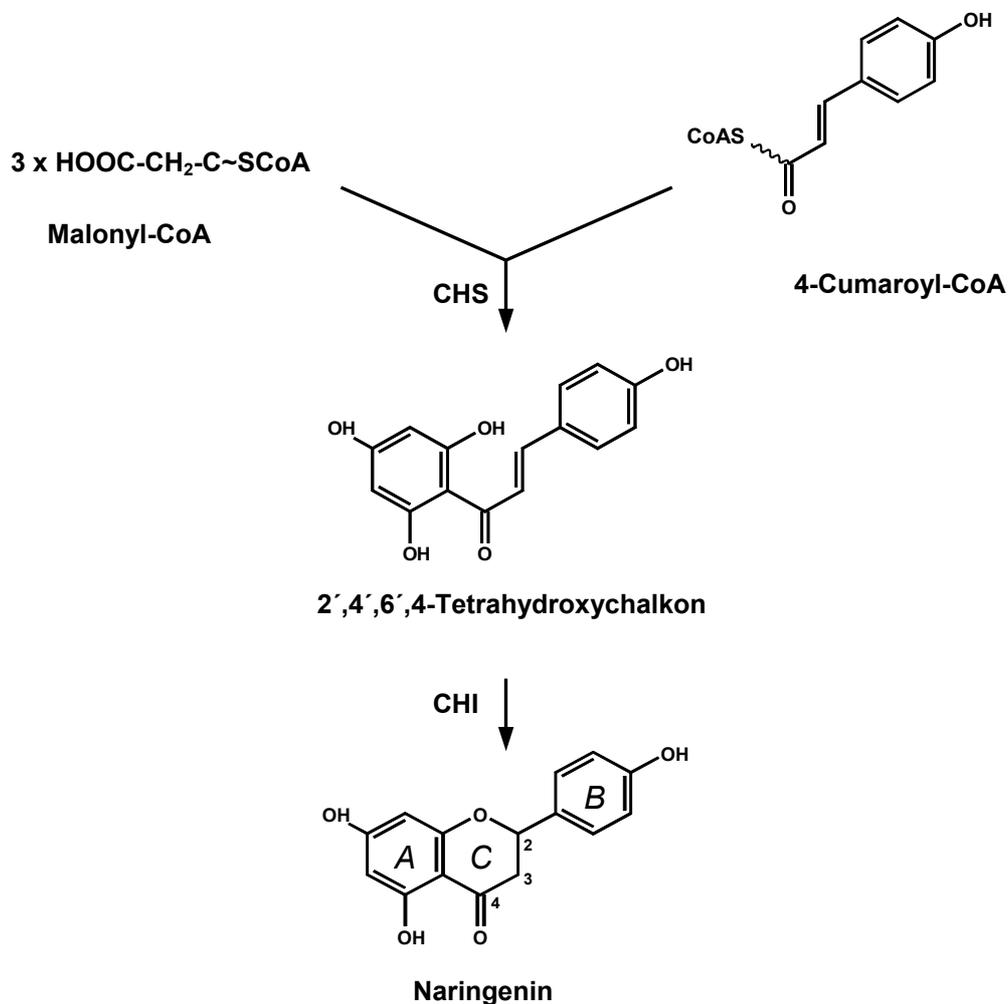


Abb. 2: Darstellung der Bildung der Flavan-Grundstruktur am Beispiel der Naringenin-Synthese. Die verschiedenen Ringsysteme sind mit A, B und C gekennzeichnet. Der Ring B und die Kohlenstoffatome 2, 3 und 4 des Heterozyklus (C) stammen vom 4-Cumaroyl-CoA. CHS, Chalkonsynthase; CHI, Chalkonisomerase.

Der erste Schritt zur Herstellung dieser Grundstruktur wird durch die Chalkonsynthase (CHS) katalysiert. Das bevorzugte physiologische Substrat der CHS scheint 4-Cumaroyl-CoA zu

sein, da Cinnamoyl-CoA, Kaffeoyl-CoA, Feruoyl-CoA und Sinapoyl-CoA von den bisher charakterisierten CHS nur schwach oder überhaupt nicht umgesetzt werden können (Heller und Forkmann, 1994). Lediglich CHS aus *Pinus sylvestris* benutzt vermutlich neben 4-Cumaroyl-CoA auch Cinnamoyl-CoA als physiologisches Substrat (Fliegmann et al., 1992). Die unterschiedlichen Substituenten am Ring B der (Iso-)Flavonoide (Hydroxylgruppen, *O*-Methylgruppen) scheinen somit hauptsächlich erst nach Bildung des Flavangerüsts mit Hilfe entsprechender Hydroxylasen und *O*-Methyltransferasen durchgeführt zu werden. Weitere Substitutionen sowohl am Ring A als auch am Heterozyklus führen zu einer außerordentlichen Vielfalt innerhalb dieser Pflanzenstoffgruppe.

Lignin ist ein Hauptbestandteil verholzter, pflanzlicher Zellwände und hat einen Anteil von ungefähr 25% am Trockengewicht von Bäumen. Nach Zellulose ist Lignin massenmäßig das zweit häufigste biologische Molekül auf der Erde. Lignin ist ein dreidimensionales Polymer, das durch Dehydrierungspolymerisation aus 4-Hydroxyphenyl- [H], Guaiacyl- [G] und/oder Syringyl-Alkoholen [S] aufgebaut wird, wobei die Zusammensetzung der einzelnen Monomere innerhalb von Pflanzengruppen, Zelltypen und Entwicklungsstadien von Geweben unterschiedlich sein kann (Chapple et al., 1992). Gymnospermen verwenden für die Ligninsynthese vornehmlich Guaiacyl-Einheiten, Angiospermen hauptsächlich Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten, während das Lignin der Gräser überwiegend aus 4-Hydroxyphenyl-Monomeren aufgebaut ist. Zusätzlich werden auch andere phenolische Komponenten wie z. B. acetylierte Hydroxycinnamoyl-Alkohole und Hydroxyzimtsäure-Ester in das Polymer eingebaut (Boudet, 1998; Sederoff et al., 1999; Ralph et al., 1999). Das eingelagerte Lignin verleiht Tracheen, Tracheiden und Sklereiden ihre Stabilität. Ferner werden nach Pathogenbefall und Verwundung verletzte Gewebe durch induzierte Ligninbildung versiegelt (Dixon und Paiva, 1995). Die Biosynthese von Lignin beginnt mit der Aktivierung der Zimtsäurederivate mit Coenzym A durch die 4CL (Abb. 3). Anschließend erfolgt eine zweistufige Reduktion der Säuregruppe durch Cinnamoyl-CoA-Reduktase (Aldehydbildung) und Cinnamylalkoholdehydrogenase (Alkoholbildung). Dieses Grundschemata der Monolignolsynthese scheint allerdings nur auf die Bildung von 4-Hydroxyphenyl-Einheiten zuzutreffen, während die Synthese von Guaiacyl- und Syringyl-Alkohol in den meisten Angiospermen vermutlich über einen anderen Weg durchgeführt wird. Lange Zeit wurde der Hydroxylierung von Ferulasäure zu 5-Hydroxyferulasäure durch die Ferulasäure-5-Hydroxylase und der anschließenden Methylierung zu Sinapinsäure durch eine S-Adenosyl-L-methionin abhängige Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase eine bedeutende Rolle in der Synthese von Syringyl-Alkohol zugewiesen (Neish, 1968; Higuchi, 1997; Whetten et al., 1998). Allerdings konnte das Zwischenprodukt 5-Hydroxyferulasäure in Pflanzen bisher noch nicht nachgewiesen werden und zudem zeigte das als Ferulasäure-5-Hydroxylase bezeichnete Enzym aus *Arabidopsis* und aus dem Amberbaum eine deutlich höhere Affinität gegenüber Coniferylaldehyd als gegenüber Ferulasäure (Humphreys et al., 1999; Osakabe et al., 1999).

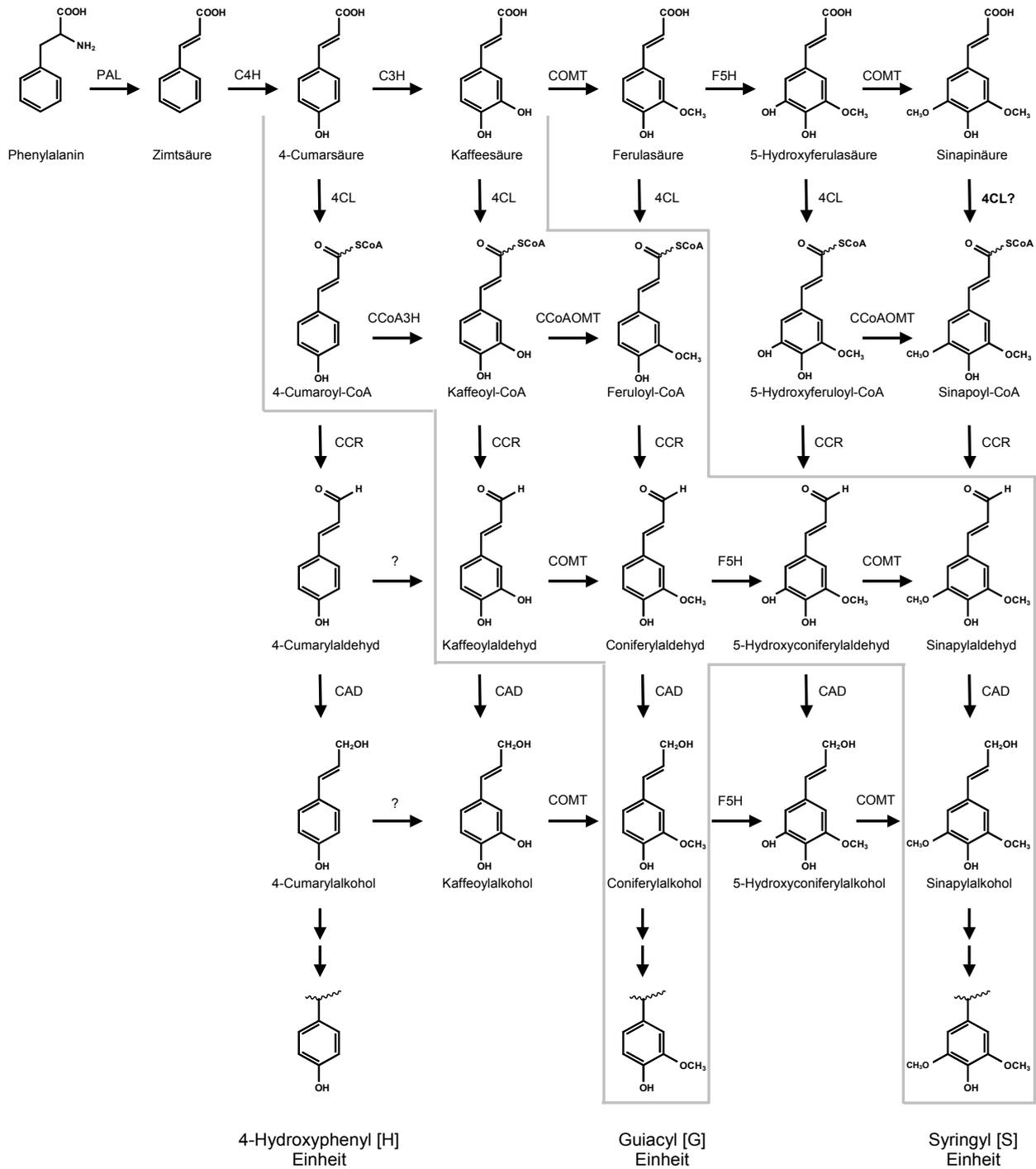


Abb. 3: Mögliche Wege zur Biosynthese von Lignin-Einheiten in Angiospermen. Synthese der Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten (grau umrahmt) unter Berücksichtigung neuerer Erkenntnisse bzgl. der Substratspezifitäten von F5H und COMT (Humphreys et al., 1999; Osakabe et al., 1999; Li et al., 2000). 4CL, 4-Cumarat:Coenzym A Ligase; C3H, Cumarsäure-3-Hydroxylase; C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase; CAD, Cinnamylalkoholdehydrogenase; CCoA3H, Cumaroyl-CoA-3-Hydroxylase; CCoAOMT, Kaffeoyle-CoA-O-Methyltransferase; CCR, Cinnamoyl-CoA-Reduktase; COMT, Kaffeesäure-O-Methyltransferase; F5H, Ferulasäure-5-Hydroxylase; PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß die 5-Hydroxylierung von Ferulasäure bzw. die *O*-Methylierung von Kaffeesäure und 5-Hydroxyferulasäure durch Coniferylaldehyd bzw. 5-Hydroxyconiferylaldehyd gehemmt wird (Li et al., 2000). Ferner wurde bisher noch keine cDNA für 4-Cumarat:CoA Ligase kloniert, die Sinapinsäure als Substrat akzeptiert, wengleich aus Erbse (*Pisum sativum*), Pappel (*Populus x euamericana*), Petunie (*Petunia hybrida*) und Sojabohne 4CL-Isoformen mit Sinapat-Aktivität angereichert werden konnten (Grand et al., 1983; Knobloch und Hahlbrock, 1975; Ranjeva et al., 1976; Wallis und Rhodes, 1977). Aufgrund dieser Erkenntnisse scheint die Synthese von Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten nicht von durch 4CL aktivierter Ferulasäure bzw. Sinapinsäure auszugehen, sondern von aktivierter 4-Cumarsäure bzw. Kaffeesäure (Li et al., 2000). Nach ihrer Synthese werden die Ligninbausteine als ihre entsprechenden Glykoside über die Plasmamembran transportiert. UDP-Glykosyltransferasen mit Aktivitäten gegenüber Zimtsäurederivaten und ihren entsprechenden Alkoholen wurden bereits beschrieben (Dharmawardhana et al., 1995; Lim et al., 2001). Nach der Radikalbildung an den Monolignolen und an dem wachsenden Ligninmolekül durch die Aktivität von Peroxidasen erfolgt vermutlich eine regulierte Polymerisierung des Lignins mit Hilfe sog. „dirigent proteins“ (Davin und Lewis, 2000; Hatfield und Vermerris, 2001).

1.4 4-Cumarat:Coenzym A Ligase (4CL)

Die 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL; EC 6.2.1.12) ist ein Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels, das in einer zweistufigen Reaktion die Aktivierung von Zimtsäurederivaten zu CoA-Thioestern durchführt (Abb. 4). Im ersten Schritt wird aus dem Zimtsäurederivat und ATP unter Freisetzung von Pyrophosphat das entsprechende Adenylat gebildet. Im zweiten Schritt erfolgt die Übertragung der Cinnamoyl-Gruppe auf Coenzym A und die Freisetzung von AMP (Heller und Forkmann, 1993). Die aktivierten Zimtsäurederivate sind Substrate für nachfolgende Kondensations-, Reduktions- und Transferreaktionen bei der Biosynthese der pflanzlichen Phenylpropanoide.

Aufgrund gemeinsamer konservierter Peptidmotive wird die 4CL einer Gruppe Adenylatbildender Enzyme zugeordnet, in der u. a. auch Luciferasen, Peptidsynthetasen, Acyl:CoA Synthetasen und Acetyl:CoA Ligasen vertreten sind (Bairoch, 1991; Fulda et al., 1994). Vor allem das Nukleotid-Bindemotiv SSGTTGLPKG (Box I der 4CL; Becker-André et al., 1991; Stuible et al., 2000; Cukovic et al., 2001) ist bei der Zuordnung zu dieser Enzymgruppe ein wichtiges Kriterium. Gemeinsam ist diesen Enzymen aber nicht der gesamte Reaktionsmechanismus, sondern nur die Aktivierung des Substrats mit ATP. Im anschließenden Reaktionsschritt wird das Substrat unter Freisetzung von AMP entweder auf Coenzym A (4CL, Acyl:CoA Synthetasen, Acetyl:CoA Ligasen), auf das Enzym-gebundene CoA-Derivat 4'-Phosphopanthetin (Peptidsynthetasen) oder auf Sauerstoff (Luciferasen)

übertragen. Einem weiteren innerhalb der Adenylat-bildenden Enzyme konservierten Motiv (GEICIRG; Box II) wird eine Beteiligung an der Katalyse zugesprochen (Becker-André et al., 1991). Es wird vermutet, daß das aktivierte Substrat kurzzeitig an die SH-Gruppe des Cystein in Box II kovalent gebunden wird bevor es auf Coenzym A übertragen wird. Ein derartiger Mechanismus wurde für die Tyrocidinsynthetase A und Enterobactinsynthetase E gezeigt (Lipman, 1980).

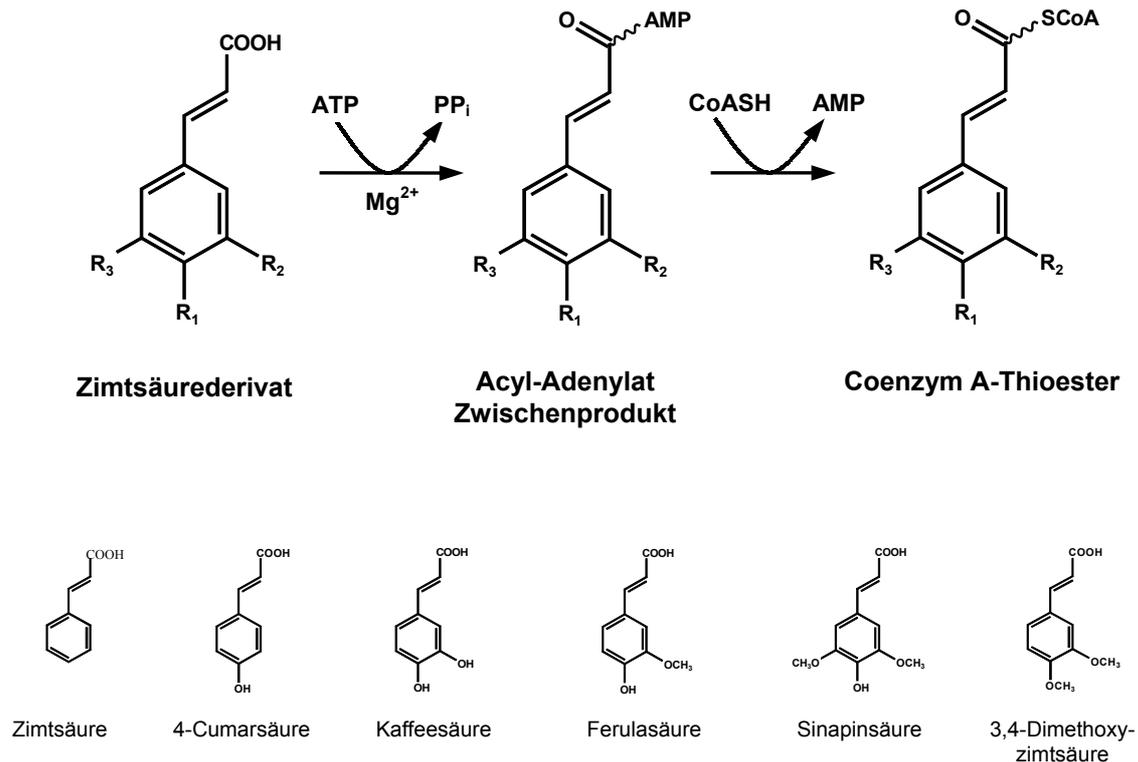


Abb. 4: Reaktionsmechanismus der Zimtsäureaktivierung durch 4-Cumarat:CoA Ligase. Die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Zimtsäurederivate sind darunter aufgeführt.

Wegen ihrer zentralen Position im allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel wird der 4CL eine wichtige regulatorische Funktion in der Bereitstellung aktivierter Zimtsäurederivate für nachfolgende Synthesen zugesprochen. Es wird vermutet, daß die Verteilung der aktivierten Zimtsäurederivate durch das Vorhandensein von 4CL-Isoformen reguliert werden kann, da sie unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen können und ihre Gene differentiell exprimiert werden können. 4CL-cDNAs und -Gene wurden bereits aus einer Vielzahl von Pflanzen isoliert (zusammengefaßt in Ehling et al., 1999). Aber nur in einigen Pflanzen, wie z. B. *Arabidopsis*, Espe (*Populus tremuloides*) und Sojabohne, kodieren die Klone für 4CL-Isoformen, die sich bzgl. ihrer Substratspezifitäten und/oder gewebespezifischen Expression unterscheiden (Lee und Douglas, 1996; Möllers, 1997; Hu et al., 1998; Ehling et al., 1999). In anderen Pflanzen, wie z. B. Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Petersilie (*Petroselinum*

crispum) und Pinie (*Pinus taeda*), wurden bisher nur Isoformen mit identischen Substratspezifitäten identifiziert (Lozoya et al., 1988; Becker-André et al., 1991; Zhang und Chiang, 1997).

Häufig diskutiert wird die Fähigkeit der 4CL, Sinapoyl-CoA zu bilden, das eine mögliche Vorstufe der Syringyl-Einheiten des Angiospermen-Lignin darstellt. Aus Sojabohne, Pappel, Erbse und Petunie konnten bereits 4CL-Isoformen angereichert werden, die Sinapinsäure aktivierten (Grand et al., 1983; Knobloch und Hahlbrock, 1975; Ranjeva et al., 1976; Wallis und Rhodes, 1977). Allerdings konnte bisher noch keine 4CL-cDNA isoliert werden, die für eine Sinapinsäure-umsetzende 4CL kodierte. Auf mögliche alternative Biosynthesewege von Syringyl-Einheiten wurde bereits im Kapitel 1.3 eingegangen.

Die meisten Arbeiten über 4CL aus Sojabohne wurden an Sojabohnenzellkulturen durchgeführt (Hahlbrock et al., 1971; Ebel et al., 1975; Knobloch und Hahlbrock, 1975; Hille et al., 1982; Uhlmann und Ebel, 1993). Vor allem in den Wachstumsstadien I und II wurden erhöhte 4CL-Aktivitäten gemessen (Ebel et al., 1974; Hille et al., 1982). Aus Sojabohnenzellkulturen des Stadium II konnten zwei 4CL-Isoenzyme partiell gereinigt werden, die sich beträchtlich in ihren Substratspezifitäten unterschieden (Knobloch und Hahlbrock, 1975). Während Ligase 2 in der Lage war, Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure umzusetzen, konnte Ligase 1 zusätzlich Sinapinsäure und das synthetische Substrat 3,4-Dimethoxyzimtsäure aktivieren. Um einen Einblick in die Regulation der 4CLs der Sojabohne zu erlangen, hatten Uhlmann und Ebel (1993) versucht, die kodierenden Sequenzen der von Knobloch und Hahlbrock (1975) partiell gereinigten 4CL-Isoformen 1 und 2 zu klonieren. Mit Hilfe einer gegen die Petersilie-4CL gerichteten, heterologen Nukleotidsonde (*Pc4CLUV16*) konnten aus einer cDNA-Bank, die aus elicitierten Sojabohnenzellkulturen des Wachstumsstadium I hergestellt worden war, die drei Teilsequenzen *Gm4CL13*, *Gm4CL14* und *Gm4CL16* isoliert werden. Die Sequenzidentität auf Nukleotidebene betrug zwischen *Gm4CL13* und *Gm4CL16* 96%, während beide Nukleotidsequenzen gegenüber *Gm4CL14* eine Identität von nur 65% aufwiesen (Uhlmann und Ebel, 1993).

Durch Verwendung von *Gm4CL14* und *Gm4CL16* als cDNA-Sonden wurde die Regulation der 4CL-Gene in Elicitor-behandelten Sojabohnenzellkulturen (Stadium I) untersucht (Uhlmann und Ebel, 1993). Allerdings mußte beachtet werden, daß *Gm4CL16* aufgrund der hohen Sequenzidentität auch mit mRNA kreuzhybridisierte, von der sich das *Gm4CL13*-cDNA Fragment ableitete. Mit *Gm4CL14* hybridisierende Transkripte waren in nicht-elicitierten Zellkulturen vorhanden und ihre Menge nahm nach Elicitorinduktion leicht zu. *Gm4CL13*/*Gm4CL16*-spezifische mRNA war nur in elicitierten Zellkulturen nachweisbar. Die gleiche Regulation der 4CL-Gene wurde in Sojabohnekeimwurzeln nach Infektion mit Zoosporen von *P. sojae* beobachtet (Uhlmann und Ebel, 1993).

Um eine Zuordnung der klonierten 4CL-cDNA-Fragmente zu den partiell gereinigten Ligasen 1 und 2 (Knobloch und Hahlbrock, 1975) zu ermöglichen, vervollständigte Möllers (1997) die

Teilsequenzen *Gm4CL13* und *Gm4CL14* und synthetisierte die entsprechenden Proteine in *Escherichia coli*. Nach den biochemischen Untersuchungen (Substratspezifitäten, K_m -Werte) der heterologen Enzyme wurden die ermittelten Werte mit den Daten verglichen, die Knobloch und Hahlbrock (1975) für Ligase 1 und 2 bestimmt hatten. Dabei zeigte sich, daß das von der vervollständigten Sequenz der *Gm4CL13* kodierte Protein weder Ligase 1 noch Ligase 2 zugeordnet werden konnte, sondern ein bisher nicht bekanntes Isoenzym 3 (*Gm4CL3*) darstellte. Die bevorzugten Substrate dieser *Gm4CL* waren 4-Cumarsäure und Kaffeesäure. Ferulasäure konnte nur in geringem Maße umgesetzt werden. Die katalytischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins, das von der kompletten Sequenz der *Gm4CL14* kodiert wurde, stimmten gut mit den von Knobloch und Hahlbrock (1975) ermittelten Werten der partiell gereinigten Ligase 2 überein. Keines der beiden rekombinanten Enzyme war somit in der Lage, Sinapinsäure oder das synthetische Substrat 3,4-Dimethoxyzimtsäure umzusetzen. Anstelle der cDNA-Sequenz für Ligase 1 lag mit *Gm4CL3* die Sequenz einer noch nicht bekannten 4CL-Isoform 3 aus Sojabohne vor.

Es stellte sich nun die Frage, ob *Gm4CL16* eine Teilsequenz der *Gm4CL1* ist oder ob *Gm4CL16* ein Fragment einer vierten Sojabohne-4CL ist und die cDNA der *Gm4CL1* folglich noch nicht isoliert wurde. Da Ligase 1 aus nicht-elicitierten Zellkulturen angereichert wurde (Knobloch und Hahlbrock, 1975), *Gm4CL16* aber ausschließlich mit RNA aus elicitierten Zellen hybridisierte (Uhlmann und Ebel, 1993), schien eher letztere Vermutung zuzutreffen. Daher wurde erneut versucht, die cDNA der Ligase 1 über die klassische Methode durch Proteinreinigung und cDNA-Bank-Sichtung zu isolieren. In Anlehnung an Knobloch und Hahlbrock (1975) wurde mittels Farbliganden- und Anionenaustauschchromatographie die Sinapinsäure-umsetzende Ligase 1 aus nicht-induzierten Sojabohnenzellkulturen (Stadium II) partiell gereinigt (C. Lindermayr, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse der Diplomarbeit, LMU München). Sowohl der N-Terminus des Enzyms (GPSPQ/REIL) als auch zwei interne Peptide S1 ([K]GYLNDPEA) und S2 ([K]ARLVLTQSAYVEK), die nach Lys C-Spaltung des gereinigten Proteins isoliert wurden, wurden durch Mikrosequenzierung erhalten (C. Lindermayr, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse der Diplomarbeit, LMU München). Der Vergleich mit bereits bekannten 4CL-Aminosäuresequenzen zeigte, daß es sich bei den Peptiden S1 und S2 eindeutig um Sequenzen einer 4CL handelte, aber nicht um Sequenzen der *Gm4CL2*, *Gm4CL3* oder *Gm4CL16*. Daraus konnte geschlossen werden, dass in Sojabohne mindestens vier 4CL-Isoformen existieren. *Gm4CL1* und *Gm4CL2*, die von Knobloch und Hahlbrock (1975) partiell gereinigt wurden und *Gm4CL3* und *Gm4CL4*, von denen Uhlmann und Ebel (1993) erstmals Teilsequenzen (*Gm4CL13*, *Gm4CL16*) isolieren konnten. Das Vorhandensein von vier Isoformen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten deutet auf eine komplexe Regulation des Phenylpropanstoffwechsel in Sojabohne hin. Um dies zu untersuchen, müssen zuerst die noch fehlenden *Gm4CL*-cDNAs isoliert bzw. vervollständigt werden. Die wichtigsten bisher erlangten Ergebnisse bezüglich 4CL aus Sojabohne sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tab. 1: Bisheriger Kenntnisstand über 4CL-Isoformen in Sojabohne.

Isoform	Bisherige Kenntnisse über die Existenz der Isoformen
<i>Gm4CL1</i>	<p>Protein aus nicht-elicitierten Sojabohnenzellkulturen partiell gereinigt. (Knobloch und Hahlbrock, 1975; C. Lindermayr, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse der Diplomarbeit, LMU München)</p> <p>Aminosäuresequenz des N-Terminus und zweier interner Peptide S1 und S2 durch Mikrosequenzierung des gereinigten Proteins erhalten. (C. Lindermayr, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse der Diplomarbeit, LMU München)</p> <p>Verhalten nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen bzw. Infektion von Sojabohnekeimlingen: nicht bekannt.</p>
<i>Gm4CL2</i>	<p>Protein aus nicht-elicitierten Sojabohnenzellkulturen partiell gereinigt. (Knobloch und Hahlbrock, 1975)</p> <p>cDNA-Fragment aus elicitierten Sojabohnenzellkulturen isoliert. (<i>Gm4CL14</i>; Uhlmann und Ebel, 1993)</p> <p><i>Gm4CL14</i> vervollständigt und in <i>E. coli</i> synthetisiert \Rightarrow <i>Gm4CL2</i>. (Möllers, 1997)</p> <p>Verhalten nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen bzw. Infektion von Sojabohnekeimlingen: Transkripte in Kontrollen nachweisbar, leichter Anstieg nach Elicitierung bzw. Infektion (Uhlmann und Ebel, 1993).</p>
<i>Gm4CL3</i>	<p>cDNA-Fragment aus elicitierten Sojabohnenzellkulturen isoliert. (<i>Gm4CL13</i>; Uhlmann und Ebel, 1993)</p> <p><i>Gm4CL13</i> vervollständigt und in <i>E. coli</i> synthetisiert \Rightarrow <i>Gm4CL3</i>. (Möllers, 1997)</p> <p>Verhalten nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen bzw. Infektion von Sojabohnekeimlingen: Transkripte nur nach Elicitierung bzw. Infektion nachweisbar (Uhlmann und Ebel, 1993).</p>
<i>Gm4CL4</i>	<p>cDNA-Fragment aus elicitierten Sojabohnenzellkulturen isoliert. (<i>Gm4CL16</i>; Uhlmann und Ebel, 1993)</p> <p>Verhalten nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen bzw. Infektion von Sojabohnekeimlingen: Transkripte nur nach Elicitierung bzw. Infektion nachweisbar (Uhlmann und Ebel, 1993).</p>

1.5 Proteinstrukturanalyse

Aufgrund seiner zentralen Bedeutung im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel ist der Phenylpropanstoffwechsel bei vielen verschiedenen Pflanzen untersucht worden. Besonders die Regulation der entsprechenden Gene und die Eigenschaften der beteiligten Enzyme wurden genauer beschrieben (z. B. Dixon und Paiva, 1995; Douglas, 1996). Die zentrale Stellung der 4CL zwischen dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel und verschiedenen Endprodukt-spezifischen Biosynthesewegen macht dieses Enzym zu einem interessanten Ziel für biotechnologische Manipulationen. Die Identifizierung funktionell wichtiger Aminosäuren könnte die Veränderung der enzymatischen Eigenschaften einzelner 4CL-Isoformen ermöglichen, wodurch direkt in die Regulation des Phenylpropanstoffwechsels eingegriffen werden und eventuell die Bildung neuartig substituierter Phenylpropanoide in Pflanzen erreicht werden könnte (Dixon und Steel, 1999).

Vergleichbare Arbeiten wurden bereits an Stilben- und Chalkonsynthesen durchgeführt. Beide sind Polyketidsynthesen, die 4-Cumaroyl-CoA und drei Moleküle Malonyl-CoA umsetzen, aber verschiedene Produkte synthetisieren. Die Aminosäuresequenzen aller bisher bekannten Stilben- und Chalkonsynthesen besitzen eine Identität von über 60%. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen und mit Hilfe gerichteter Mutagenesen ist es gelungen, das aktive Zentrum beider Enzyme zu identifizieren (Lanz et al., 1991). Durch die mittlerweile verfügbare dreidimensionale Struktur der Chalkonsynthase aus *Medicago sativa* konnten die zuvor gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden (Ferrer et al., 1999). Ebenso zur Gruppe der Polyketidsynthesen gehört die Acridonsynthase, die aber im Gegensatz zu Stilben- und Chalkonsynthesen *N*-Methylanthraniloyl-CoA anstatt 4-Cumaroyl-CoA als Substrat benötigt. Aufgrund der hohen Identität der Aminosäuresequenz gegenüber Chalkonsynthesen (ca. 75%) konnte in Anlehnung an die Kristallstruktur der Chalkonsynthesen ein Strukturmodell der Acridonsynthase erstellt werden. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen und mit Hilfe dieses dreidimensionalen Strukturmodells konnten drei Aminosäuren der Acridonsynthase identifiziert werden, die eine wichtige Rolle bei der Substratbindung spielen. Werden diese Aminosäuren durch die homologen Aminosäuren der Chalkonsynthase ersetzt, wird die Acridonsynthase in eine funktionelle Chalkonsynthase umgewandelt (Lukacin et al., 2001). Diese Arbeiten zeigen deutlich, welches Potential hinter den gezielten Aminosäureveränderungen im Hinblick auf die Herstellung von Enzymen mit neuen katalytischen Eigenschaften und die Synthese neuartiger Substanzen steckt.

Aus der Familie der Adenylat-bildenden Enzyme wurden die Raumstrukturen der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase (PheA) aus *Brevibacillus brevis* und der Luciferase aus *Photinus pyralis* ermittelt (Conti et al., 1996; Conti et al., 1997). Aufgrund ihrer funktionellen Verwandtschaft zeigten beide Proteine trotz der geringen Identität ihrer Aminosäuresequenzen (18%) zahlreiche Gemeinsamkeiten in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur (Conti et al., 1997). Dies deutete darauf hin, daß die bei PheA

gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Substratbindung eventuell auf andere Adenylatbildende Enzyme, z. B. 4CL, übertragen werden könnten.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Untersuchungen zur Aktivierung von ringssubstituierten Zimtsäuren durch 4CL und zur Regulation des Enzyms wurden in der Vergangenheit vorwiegend an Pflanzen und daraus abgeleiteten Zellkulturen durchgeführt, in denen entweder nur eine Enzymform vorkommt oder Isoenzyme, die funktionell gleichbedeutend sind (Heller und Forckmann, 1993). In einigen Pflanzen gibt es jedoch Beweise für die Existenz von funktionell unterschiedlichen 4CL-Isoformen (z. B. Hu et al., 1998; Ehling et al., 1999).

Es liegen nur geringe Kenntnisse über die regulatorische Bedeutung der 4CL im streßaktivierten Phenylpropanstoffwechsel vor (Dixon und Paiva, 1995). Einerseits wird unter verschiedenen äußeren Einflüssen einschließlich der Infektabwehr die Expression von Genen für Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (Phenylalanin-Ammonium-Lyase, Zimtsäure-4-Hydroxylase, 4CL) in vielen untersuchten Systemen streng koordiniert reguliert (Somssich und Hahlbrock, 1998). Andererseits bleibt das postulierte Modell für die wichtige regulatorische Rolle der 4CL bei der Verteilung von CoA-Estern substituierter Zimtsäuren auf nachgeschaltete Biosynthesewege für spezifische Phenylpropanverbindungen in den meisten Fällen vorerst Hypothese. Bezüglich der Mechanismen der Substratbindung und Substratumsetzung der 4CL ist ebenfalls noch sehr wenig bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Genfamilie der 4CL in Sojabohne vollständig zu erfassen und molekular, biochemisch und physiologisch zu beschreiben. Dazu war es nötig, die cDNA der Sinapinsäure-umsetzenden *Gm4CL1* zu isolieren und die Teilsequenz der *Gm4CL4*-cDNA (*Gm4CL16*) zu vervollständigen. Ferner sollten mögliche Substratbindemotive identifiziert werden. Dabei sollten vor allem Sequenzmotive untersucht werden, die im Zusammenhang mit der Bindung der Zimtsäurederivate der 4CL stehen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders aufgeführt wurden die allgemeinen Laborchemikalien und Lösungsmittel von Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt) oder Serva (Heidelberg) bezogen und waren stets von analysenreiner Qualität.

Des weiteren wurden verwendet:

DNA-Größenstandard peqGOLD 1 kb DNA-Leiter	peqLab (Erlangen)
Proteingrößenstandard „prestained protein marker“, broad range (6-175 kDa)	NEB (Frankfurt)
RNA-Größenstandard	Gibco/BRL (Karlsruhe)
[α - ³⁵ S]dATP (37 TBq/mmol; 370 MBq/ml)	Amersham (Braunschweig)
[α - ³² P]dCTP (111 TBq/mmol; 370 MBq/ml)	Amersham (Braunschweig)
dNTPs	Gibco/BRL (Karlsruhe)
Heringsperma-DNA	Appligene (Heidelberg)
Random Primer	Gibco/BRL (Karlsruhe)
Nitrocellulosemembran (45 μ m Porengröße)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nitrocellulosemembran (45 μ m Porengröße, \varnothing 8,2 cm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nylonmembran Biotodyne A	Pall (Dreieich)
Mikrospin-Säulen S-200	Pharmacia (Freiburg)
PD10-Säulen	Pharmacia (Freiburg)
Bio-Rad Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Bacto-Trypton	Difco (Heidelberg)
Hefeextrakt	Difco (Heidelberg)
Lima-Bean-Medium	Difco (Heidelberg)

2.1.2 Geräte und Zubehör

Neben der üblichen Laborausstattung wurden verwendet:

Sorvall-Kühlzentrifugen RC-5B und RC-5	Du Pont Instruments (Bad Homburg)
Mikro Rapid Tischzentrifuge	Hettich (Tuttlingen)
Kühlzentrifuge Typ 3K12	Sigma (Osterode)
SE 250 Mighty Small II Gelkammer	Pharmacia (Freiburg)
Semidry-Blotting-Apparatur Multiphor II	Pharmacia (Freiburg)
Spektralphotometer Ultrospec 3000 UV/Visible	Pharmacia (Freiburg)
Branson-Sonifier II 450	Heinemann Laboratoriums- Ausrüstung (Schwäbisch-Gmünd)
Rosettgefäß (3-15 ml)	Heinemann Laboratoriums- Ausrüstung (Schwäbisch-Gmünd)
Genepulser II	Biorad (München)
UNO II-Thermozykler	Biometra (Göttingen)
Macrophor-Sequenzierapparatur	Pharmacia (Freiburg)
Phosphoimager BAS-1500	Fuji (Düsseldorf)
UV-Crosslinker	Amersham (Braunschweig)
Leitfähigkeitsmeßgerät Konduktometer 702	Knick (Berlin)

2.1.3 Reaktionssysteme und Kits

PolyATtract mRNA Isolation System	Promega (Mannheim)
SUPERScript Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning	Gibco/BRL (Karlsruhe)
Packagene Lambda DNA Packaging System	Promega (Mannheim)
5'-RACE Kit	Gibco/BRL (Karlsruhe)
JETstar MINI/MIDI	Genomed (Bad Oeynhausen)
Prime-a-Gene Labeling System	Promega (Mannheim)
Clean-a-Gene DNA Purification Kit	Renner (Dannstadt)
DNA Sequencing Kit Sequenase Version 2.0	Amersham Life Science (Cleveland)
QIAexpress Type IV Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.4 Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt wurden Restriktionsendonukleasen von Fermentas/MBI (St. Leon-Rot), NEB (Frankfurt) oder Promega (Mannheim) bezogen.

Ferner wurden verwendet:

<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Appligene (Heidelberg)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
S1-Nuklease	Promega (Mannheim)
Klenow-Enzym	Promega (Mannheim)
T4-DNA-Ligasen	Gibco/BRL (Karlsruhe) Fermentas/MBI (St. Leon-Rot)
Reverse Transkriptase	Gibco/BRL (Karlsruhe)

2.1.5 Vektoren

pGEM-T	Promega (Mannheim)
pZL1	Gibco/BRL (Karlsruhe)
pSPORT	Gibco/BRL (Karlsruhe)
pQE-30,-31,-32	Qiagen (Hilden)
pTZ19R	Zagurski und Berman, 1984
pBluescript II KS	Short et al., 1988

2.1.6 Bakterienstämme

Escherichia coli

DH5 α	F ⁻ ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 λ⁻ thi gyrA96 relA1</i> (Hanahan, 1983)
JM109	<i>recA1 end A1 thi gyrA96 hsdR17 supE44 λ⁻ relA1 Δ(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB lac^gΔM15</i>] (Yanish-Perron et al., 1985)
SG13009[pREP4]	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ (Gottesmann et al., 1981; Bestandteil des Kits „QIAexpress Type IV“; Qiagen, Hilden)

M15[pREP4]	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ (Bestandteil des Kits „QIAexpress Type IV“; Qiagen, Hilden)
Y1090(ZL)	mcrB hsdR (Bestandteil des Kit: SUPERSCRIPT Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning; Gibco/BRL, Karlsruhe)
DH10B(ZIP)	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara leu)7697 galU galK λ rpsL nupG (Bestandteil des Kit: SUPERSCRIPT Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning; Gibco/BRL, Karlsruhe)

Die *E. coli* Stämme DH5 α und JM109 waren im Labor vorhanden.

2.1.7 Computerprogramme

Zum Vergleich von DNA- und Protein-Sequenzen:

PC/GENE	Intelli Genetics (Genf/Schweiz)
BioEdit, Version 4.8.10	Hall T.A. (1999)

Zur Ermittlung der Schmelztemperatur von Oligonukleotiden:

Oligoed	Werner T., GSF (Neuherberg)
---------	-----------------------------

Zur Analyse von DNA-Sequenzierungen:

Chromas 1.5	Technelysium (Queensland, Australien)
-------------	---------------------------------------

Zur Auswertung und graphischen Darstellung von Versuchsergebnissen:

SigmaPlot 5.0	Jandel Scientific (USA)
---------------	-------------------------

Zur 3D-Strukturmodellierung von Proteinen:

SWISS-MODEL	SWISS Institute of Bioinformatics (Genf, Schweiz), http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html
SWISS-PDBViewer v3.6b3	SWISS Institute of Bioinformatics (Genf, Schweiz), http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html

Zum Durchmustern von DNA- und Protein-Datenbanken:

Advanced BLAST Search	National Center of Biological Information (Bethesda, USA), http://www.ncbi.nlm.nih.gov
FASTA3	European Molecular Biology Laboratory (Cambridge, UK), http://www.embl-heidelberg.de
PDB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (New Jersey, USA), http://www.rcsb.org/pdb/

2.1.8 Verwendete Puffersysteme und Lösungen

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Für die Extraktion der 4CL:

aus *E. coli*: 50 mM Tris/HCl (pH 7,9); 14 mM β -Mercaptoethanol; 30% (v/v) Glycerin
 aus Pflanzenmaterial: 0,2 M Tris/HCl (pH 8,0); 14 mM β -Mercaptoethanol; 30% (v/v) Glycerin

Für den direkten spektralphotometrischen Enzymtest:

Zimtsäurederivate: Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure wurden in 0,1 M KOH gelöst. Da Kaffeesäure in alkalischer Lösung sehr instabil ist, wurde sie in 3/4 des benötigten Volumen von 0,1 M KOH gelöst und sofort mit 0,2 M Tris/HCl (pH 8,0) (1/4 des benötigten Volumens) versetzt. Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure sind zudem lichtempfindlich, weshalb die Lösungen täglich frisch angesetzt wurden.

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Coomassie-Farbstoffreagenz: 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol
 Entfärber-Lösung: 10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol
 10 x Laufpuffer: 0,25 M Tris; 0,2 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS
 Proteinprobenpuffer: 0,15 M Tris/HCl (pH 8,8); 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0,01% (w/v) Bromphenolblau; Proteinaseinhibitoren: 0,5 μ g/ml Leupeptin, 0,5 μ g/ml Aprotinin, 2 mM Aminocaprinsäure, 2 mM PMSF
 Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8); 0,4% (w/v) SDS
 Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,4% (w/v) SDS

Für den Transfer und die Immunodetektion von Proteinen:

Alkal. Phosphatase Puffer: 0,1 M Tris/HCl (pH 9,5); 0,1 M NaCl; 5 mM $MgCl_2$
 (AP-Puffer)
 Blockpuffer: 0,5% (v/v) Tween 20; 1% (w/v) Magermilchpulver; 1% (w/v) BSA in TBS-Puffer
 Diskontinuierl. Puffersystem für Proteintransfer:
 - Anodenpuffer I: 0,3 M Tris; 20% (v/v) Methanol
 - Anodenpuffer II: 0,025 M Tris; 20% (v/v) Methanol
 - Kathodenpuffer: 0,04 M Aminocaprinsäure; 0,01% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol
 Inkubationspuffer: 0,5% (v/v) Tween 20; 1% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer
 Ponceau-S-Lösung: 1% (w/v) Ponceau-S in 2% (v/v) Essigsäure
 Reaktionspuffer: 0,165 mg/ml BCIP und 0,33 mg/ml NBT in AP-Puffer
 TBS-Puffer: 0,01 M Tris/HCl (pH 7,4); 0,9% (w/v) NaCl; 1 mM $MgCl_2$
 Waschpuffer: 0,5% (v/v) Tween 20 in TBS-Puffer

Für die Metallchelate-Affinitätschromatographie:

Äquilibriumspuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,9); 14 mM β -Mercaptoethanol; 100 mM NaCl; 30% (v/v) Glycerin
Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,9); 14 mM β -Mercaptoethanol; 100 mM NaCl; 100 mM Imidazol; 30% (v/v) Glycerin
Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,9); 14 mM β -Mercaptoethanol; 100 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 30% (v/v) Glycerin

Für die Isolierung, die gelelektrophoretische Auftrennung, den Transfer und den Nachweis von Nucleinsäuren:

CTAB-Lösung:	10% (w/v) CTAB; 1,4 M NaCl
DNA-Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
DNA-Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl; 1 M Tris (pH 8,0)
10 x DNA-Probenpuffer:	10 x TAE-Puffer; 30% (v/v) Glycerin; Spatelspitze Orange G
Hybridisierungspuffer:	45% (v/v) Puffer N; 5% (v/v) TE-Puffer; 0,1% (w/v) PVP-40; 0,1% (w/v) Ficoll; 0,1% (w/v) BSA; 45% (v/v) deionisiertes Formamid, 5% (v/v) Heringssperma-DNA (2 mg/ml)
Lösung I:	25 mM Tris (pH 8,0); 10 mM EDTA; 50 mM D-Glucose
Lösung II:	1% SDS; 0,2 N NaOH
Lösung III:	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Methylenblau-Lösung:	0,5 M Natriumacetat (pH 5,2); 0,04% (w/v) Methylenblau
Puffer N:	0,1 M NaH_2PO_4 (pH 7,0); 1,8 M NaCl; 10 mM EDTA; 0,2% (w/v) SDS
RNA-Extraktionspuffer:	100 mM Tris/HCl (pH 8,0); 2% (w/v) CTAB; 2% (w/v) PVP K30; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 0,5 g/l Spermidin; 2% (v/v) β -Mercaptoethanol
RNA-Denaturierungspuffer:	1M Glyoxal; 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5); 50% (v/v) DMSO
RNA-Probenpuffer:	10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5); 50% (v/v) Glycerin; 0,4% (w/v) Bromphenolblau
20 x SSC:	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0)
SSTE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 0,5% (w/v) SDS; 1 M NaCl
TAE-Laufpuffer:	40 mM Trisbase; 0,11% (v/v) Eisessig; 2 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

Für die Stabilisierung von Phagen:

SM-Puffer:	0,1 M NaCl; 8 mM MgSO_4 ; 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 0,01% (w/v) Gelatine
------------	--

2.1.9 Verwendete Medien

Zur Herstellung der Medien wurde deionisiertes Wasser verwendet.

L-Medium:	1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; 10 mM MgSO_4 ; (pH 7,2)
LB-Medium:	1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; (pH 7,5)
Lima-Bean-Medium:	23g in 1 Liter Wasser lösen

SOC-Medium:	2% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose; (pH 7,0)
Weichagar:	1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) NaCl; 10 mM MgSO ₄ ; 0,7% (w/v) Agar; (pH 7,2)

Falls nötig wurden dem L- oder LB-Medium folgende Zusätze zugegeben:

- 1,5% (w/v) Agar für L- oder LB-Agarplatten
- 25 µg Kanamycin und/oder 100 µg Ampicillin pro Milliliter Medium
- 0,005% (w/v) X-Gal und 0,4 mM IPTG
- 0,2% (w/v) Maltose

2.1.10 Oligonukleotide

Die Oligonukleotidsynthese wurde bei MWG-Biotech (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) in Auftrag gegeben. Enthaltene Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Degenerierte *Gm4CL1*-Oligonukleotide

4CL1-S1	5'-TCYGGRTCRTTNAGRTADCCTTTCAT-3'
4CL1-S2	5'-TBACNCARTCNGCNTAYGTBGARAA-3'
4CL1-S3	5'-GARATHATHYTVMRRTCRAARYT-3'

Oligonukleotide für 5'-RACE

4CL1-GSP1	5'-GTTGCGTAGGACGAGCAT-3'
4CL1-GSP2	5'-CGGATGCCGATTTTGTGGAGG-3'
4CL16-GSP1	5'-TGTTCCGGAGAGCCTCCTC-3'
4CL16-GSP2	5'-CAACGGAAGCACGCATAGGAGCAC-3'
Anker-Primer	5'-GGCCACGCGT <u>CGACT</u> AGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3'

Oligonukleotide zur Eliminierung des Startcodon

4CL1- <i>Kpn</i> I	5'-GCTGGT <u>ACCG</u> CACCTTCTCCACAAG-3'
4CL4- <i>Sph</i> I	5'-C <u>ACCGCATGC</u> ATAACTCTAGCTCCTTCTCTTG-3'

Oligonukleotide für *Gm4CL1*/*Gm4CL3*-Hybridbildung

4CL1- <i>Hind</i> III-Forward	5'-GAGA <u>AAGCTT</u> AAGAGTTTCGCGGAC-3'
4CL1- <i>Age</i> I-Forward	5'-CAC <u>ACCGGT</u> GATATTGGTTTCATTGATG-3'
4CL1- <i>Hind</i> III-Reverse	5'-GACA <u>AAGCTT</u> GACCTAATTGGCCACC-3'
4CL3- <i>Spl</i> I-Forward	5'-GCA <u>ACGTACG</u> TGGACAAGCTTCGCAAC-3'
4CL3- <i>Xma</i> III-Forward	5'-GGG <u>ACGGCCG</u> TTTTGTTGATGCAGAAGTTCG-3'
4CL3- <i>Hind</i> III-Reverse	5'-GTTCTA <u>AAGCTT</u> TTAAGGCGTCTGAGTGGC-3'

Oligonukleotide zur Mutation der *Gm4CL1*

FA283-Forward	5'-GTTGCGTCGGCTGTGCCGCC-3'
FA283-Reverse	5'-GGCGGCACAGCCGACGCAAC-3'
VA284-Forward	5'-GCGTCGTTTGCGCCGCCATC-3'
VA284-Reverse	5'-GATGGCGGCGCAAACGACGC-3'

PA285-Forward	5'-CGTCGTTTGTGGCGCCCATCGT-3'
PA285-Reverse	5'-ACGATGGGCGCCACAAACGACG-3'
PA286-Forward	5'-CGTTTGTGCCGGCCATCGTTTTG-3'
PA286-Reverse	5'-CAAAACGATGGCCGGCACAAACG-3'
TA331-Forward	5'-CTACCACACGCTGCTTTTGGACAGGG-3'
TA331-Reverse	5'-CCCTGTCCAAAAGCAGCGTGTGGTAG-3'
GA333-Forward	5'-ACACGCTACTTTTGCACAGGGATATGGG-3'
GA333-Reverse	5'-CCCATATCCCTGTGCAAAAGTAGCGTGT-3'
QA334-Forward	5'-GCTACTTTTGGAGCGGGATATGGGATG-3'
QA334-Reverse	5'-CATCCCATATCCCGCTCCAAAAGTAGC-3'
GA335-Forward	5'-ACTTTTGGACAGGCATATGGGATGACAGA-3'
GA335-Reverse	5'-TCTGTCATCCCATATGCCTGTCCAAAAGT-3'
YA336-Forward	5'-TTTGGACAGGGAGCTGGGATGACAGA-3'
YA336-Reverse	5'-TCTGTCATCCCAGCTCCCTGTCCAAA-3'
GA337-Forward	5'-GGACAGGGATATGCGATGACAGAAGCA-3'
GA337-Reverse	5'-TGCTTCTGTCATCGCATATCCCTGTCC-3'
MA338-Forward	5'-CAGGGATATGGGGCGACAGAAGCAG-3'
MA338-Reverse	5'-CTGCTTCTGTCGCCCCATATCCCTG-3'
TA339-Forward	5'-GGATATGGGATGGCAGAAGCAGGACC-3'
TA339-Reverse	5'-GGTCTGCTTCTGCCATCCCATATCC-3'
EA340-Forward	5'-TATGGGATGACAGCAGCAGGACCACTT-3'
EA340-Reverse	5'-AAGTGGTCCTGCTGCTGTCATCCATA-3'
GA342-Forward	5'-GATGACAGAAGCAGCACCCTTGCCATTAG-3'
GA342-Reverse	5'-CTAATGGCAAGTGGTGTGCTTCTGTCATC-3'
PA343-Forward	5'-GACAGAAGCAGGAGCACTTGCCATTAGC-3'
PA343-Reverse	5'-GCTAATGGCAAGTGTCTCCTGCTTCTGTC-3'
LA344-Forward	5'-GAAGCAGGACCAGCTGCCATTAGCATG-3'
LA344-Reverse	5'-CATGCTAATGGCAGCTGGTCCTGCTTC-3'
IA346-Forward	5'-GACCACTTGCCGCTAGCATGGCATT-3'
IA346-Reverse	5'-AAATGCCATGCTAGCGGCAAGTGGTC-3'
MA348-Forward	5'-TGCCATTAGCGCGGCATTTGCA-3'
MA348-Reverse	5'-TGCAAATGCCGCGCTAATGGCA-3'
4CL1iV344-Forward	5'-GATGACAGAAGCAGGACCAGTACTTGCCATTAGCATGGC-3'
4CL1iV344-Reverse	5'-GCCATGCTAATGGCAAGTACTGGTCCTGCTTCTGTCATC-3'

Oligonukleotide zur Mutation der *Gm4CL2*

4CL2dV345-Forward	5'-GAATGACTGAGGCAGGGCCTCTAACAATGTCTTTAGC-3'
4CL2dV345-Reverse	5'-GCTAAAGACATTGTTAGAGGCCCTGCCTCAGTCATTC-3'
4CL2dV345Q321-Forward	5'-GGTAAGGAACCTCCAAGACACTCTCAG-3'
4CL2dV345Q321-Reverse	5'-CTGAGAGTGTCTTGGAGTTCCTTACC-3'
4CL2dV345G318Q321-Forward	5'-CCCTCTGGGTGGGGAACCTCCAAGACACTCTC-3'
4CL2dV345G318Q321-Reverse	5'-GAGAGTGTCTTGGAGTTCCTTACCAGAGGG-3'

Oligonukleotide zur Mutation der *Gm4CL3*

4CL3dV367-Forward	5'-GGATGACAGAAGCAGGACCCTGTCCATGTGCTTGGG-3'
4CL3dV367-Reverse	5'-CCCAAGCACATGGACAGTGGTCCTGCTTCTGTCATCC-3'

Oligonukleotide für Sequenzierungsreaktionen

4CL1-DVM-Reverse	5'-TGCACATCACCATGACATC-3'
4CL1-EMK-Forward	5'-CGAGATGAAAATCGTGGAT-3'
4CL1-AVL-Forward	5'-CCGTGCTTATTTTGCAGAAG-3'
4CL1-LIE-Reverse	5'-TCACCTTGTACTTCTCGATGAG-3'
4CL1-QSA-Forward	5'-GCAATCCGCGTACGTAGAG-3'
4CL1-ELF-Reverse	5'-CGATCAACAATGAAGAGTTCA-3'
4CL2-DLS-Forward	5'-GACCTGTCTTCCATCAGAGTC-3'
4CL3-LSS-Forward	5'-CTGAGTTCAATACGGTTAGTGC-3'
4CL16-ITQ-Reverse	5'-CACGTACATTGCCTGTGTTATG-3'
4CL16-LISS-Reverse	5'-GATCTTGCTGGAAATGAGG-3'
4CL4-TLA-Forward	5'-CTCTAGCTCCTTCTCTTGATACTCC-3'
pQE-Forward	5'-GATTCAATTGTGAGCGGA-3'
pQE-Reverse	5'-AGCGTTCTGAACAAATCC-3'
Seq1	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Seq2	5'-TCTAATACGACTCACTATAGGG-3'

2.1.11 Verwendete abgeleitete Aminosäuresequenzen

Die GenBank-Zugangsnummern der verwendeten abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Klammern angegeben.

Acetyl:CoA Ligasen*Bacillus subtilis**BsAL* (P39062)*Deinococcus radiodurans**DrAL* (AE001905)**Acyl:CoA Synthetase***Bacillus subtilis**BsAS* (AAF32337)**4-Chlorobenzoyl:CoA Ligase***Pseudomonas sp.**Ps4CbL* (AF051771)**4-Cumarat:CoA Ligasen***Arabidopsis thaliana**At4CL1* (U18675)*At4CL2* (AF106086)*At4CL3* (AF106088)*Glycine max**Gm4CL1* (AF279267)*Gm4CL2* (AF002259)*Gm4CL3* (AF002258)*Gm4CL4* (X69955)*Lithospermum erythrorhizon**Le4CL1* (D49366)*Le4CL2* (D49367)*Lolium perenne**Lp4CL1* (AF052221)*Lp4CL2* (AF052222)*Lp4CL3* (AF052223)

<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nt4CL</i> (D43773) <i>Nt4CL1</i> (U50845) <i>Nt4CL2</i> (U50846)
<i>Oryza sativa</i>	<i>Os4CL1</i> (X52623) <i>Os4CL2</i> (L43362)
<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Pc4CL1</i> (X13324) <i>Pc4CL2</i> (X13325)
<i>Pinus taeda</i>	<i>Pt4CL1</i> (U12012) <i>Pt4CL2</i> (U12013)
<i>Populus hybrida</i>	<i>Poph4CL1</i> (AF008184) <i>Poph4CL2</i> (AF008183)
<i>Populus tremuloides</i>	<i>Popt4CL1</i> (AF041049) <i>Popt4CL2</i> (AF041050)
<i>Rubus idaeus</i>	<i>Ri4CL1</i> (AF239687) <i>Ri4CL2</i> (AF239686) <i>Ri4CL3</i> (AF239685)
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>St4CL1</i> (M62755) <i>St4CL2</i> (AF150686)
<i>Vanilla planifolia</i>	<i>Vp4CL</i> (X75542)

Phenylalanin-aktivierende Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase

<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>BbPheA</i> (P14687)
-----------------------------	------------------------

Luciferase

<i>Photinus pyralis</i>	<i>PpLuc</i> (P08659)
-------------------------	-----------------------

Phenylacetyl:CoA Ligase

<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>PcPhaL</i> (AJ001540)
--------------------------------	--------------------------

Peroxisomale CoA-Synthetase

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ScPCS</i> (P38137)
---------------------------------	-----------------------

2.1.12 Genspezifische Gm4CL-Sonden für Northern-Hybridisierung

Gm4CL1: *Gm4CL1*-S1/S2-PCR-Fragment (0,85 kb) mit 4CL1-S1 und 4CL1-S2 als PCR-Primer

Gm4CL2: *SalI/KpnI*-Fragment (1 kb) aus pQE-30/*Gm4CL2*

Gm4CL3/4: *SacI*-Fragment (0,9 kb) aus pQE-31/*Gm4CL3*

2.1.13 Genspezifische Gm4CL-Sonden für Southern-Hybridisierung

Gm4CL1: *KpnI/HindIII*-Fragment aus pQE-30/*Gm4CL1*

Gm4CL2: *HindIII*-Fragment aus pQE-30/*Gm4CL2*

Gm4CL3/4: *BamHI/HindIII*-Fragment aus pQE-31/*Gm4CL3*

2.1.14 Verwendete cDNA-Plasmide

Tab. 2: Zusammenstellung der verwendeten cDNA-Plasmide und Beschreibung der Insertionen.

Bezeichnung	Beschreibung der Insertion
pGEM-T/ <i>Gm4CL1-S1/S2</i>	PCR-Fragment der <i>Gm4CL1</i> amplifiziert mit 4CL1-S1 und 4CL1-S2 als PCR-Primer; 834 bp.
pSPORT/ <i>Gm4CL1-5'</i>	5'-RACE-Fragment der <i>Gm4CL1</i> cDNA in <i>SalI</i> -Schnittstelle von pSPORT; 216 bp mit 35 bp 5'-NTR und 16 bp des Poly-C-Ankers.
pZL1/ <i>Gm4CL1-3'</i>	Partielle <i>Gm4CL1</i> isoliert aus cDNA-Bank und über <i>SalI/NotI</i> in pZL1 kloniert; 1736 bp mit 149 bp 3'-NTR.
pZL1/ <i>Gm4CL1</i>	Gesamte Sequenz der <i>Gm4CL1</i> über <i>SalI/NotI</i> in pZL1; 5'-RACE-Produkt der <i>Gm4CL1</i> wurde über vektoreigene und sequenzinterne <i>SalI</i> -Schnittstelle in pZL1/ <i>Gm4CL1-3'</i> kloniert. 1841 bp mit 35 bp 5'-NTR, 16 bp des Poly-C-Ankers und 149 bp 3'-NTR.
pZL1/ <i>Gm4CL1-KpnI</i>	Offener Leserahmen der <i>Gm4CL1</i> mit 3'-NTR über <i>KpnI/NotI</i> in pZL1 kloniert; Startcodon wurde durch Einführung einer <i>KpnI</i> -Schnittstelle eliminiert; 1787 bp mit 149 bp 3'-NTR.
pQE-30/ <i>Gm4CL1-KpnI</i>	Offener Leserahmen der <i>Gm4CL1</i> mit 3'-NTR über <i>KpnI/HindIII</i> in pQE-30 kloniert (siehe pZL1/ <i>Gm4CL1-KpnI</i>).
pQE-30/ <i>Gm4CL1</i>	Offener Leserahmen der <i>Gm4CL1</i> über <i>KpnI/HindIII</i> in pQE-30 kloniert; Sequenz wurde mittels RT-PCR mit 4CL1- <i>KpnI</i> und 4CL1- <i>HindII</i> -Reverse als Primer amplifiziert; 1638 bp; Startcodon wurde durch Einführung einer <i>KpnI</i> -Schnittstelle eliminiert.
pQE-30/ <i>Gm4CL2</i>	<i>Gm4CL2</i> cDNA mit 3'-NTR über <i>BamHI/HindIII</i> in pQE-30 kloniert; nicht-translatierter 5'-Bereich wurde durch Einführung einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle direkt in 5'-Richtung vom Startcodon eliminiert; 1869 bp mit 225 bp 3'-NTR (Möllers, 1997).
pTrcHisB/ <i>Gm4CL3</i>	<i>Gm4CL3</i> cDNA mit 3'-NTR über <i>EcoRI</i> in pTZ19R kloniert; 5'-NTR wurde durch Einführung einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle direkt in 5'-Richtung vom Startcodon eliminiert; 1910 bp mit 197 bp 3'-NTR (Möllers, 1997).
pQE-31/ <i>Gm4CL3</i>	<i>Gm4CL3</i> cDNA mit nicht-translatiertem 3'-Bereich über <i>SmaI</i> in pQE-31 kloniert; 1910 bp mit 197 bp 3'-NTR.
pTZ19R/ <i>Gm4CL16</i>	Partielle <i>Gm4CL4</i> cDNA in <i>EcoRI</i> -Schnittstelle von pTZ19R kloniert; 1487 bp mit 218 bp 3'-NTR (Uhlmann und Ebel, 1993).
pGEM-T/ <i>Gm4CL4-5'</i>	5'-RACE-Fragment der <i>Gm4CL4</i> in pGEM-T kloniert; 471 bp mit 34bp 5'-NTR.
pTZ19R/ <i>Gm4CL4-SphI</i>	Offener Leserahmen der <i>Gm4CL4</i> cDNA mit 3'-NTR über <i>SphI/EcoRI</i> in pTZ19R kloniert; Startcodon wurde durch Einführung einer <i>SphI</i> -Schnittstelle eliminiert; 1904 bp mit 218 bp 3'-NTR.
pQE-30/ <i>Gm4CL4</i>	Offener Leserahmen der <i>Gm4CL4</i> cDNA über <i>SphI/HindIII</i> in pQE-30 kloniert; Startcodon wurde durch Einführung einer <i>SphI</i> -Schnittstelle eliminiert; 3'-NTR wurde durch Einführung einer <i>HindIII</i> -Schnittstelle direkt nach dem Stopcodon eliminiert; 1686 bp.

2.1.15 Pflanzenmaterial

Die Zellsuspensionskultur der Sojabohne (*Glycine max* L. cv. Harosoy 63) war in der Arbeitsgruppe vorhanden. Sie hatte ihren Ursprung in Hypokotylgewebe von Sojabohnekeimlingen (Ebel et al., 1976).

Saatgut von *Glycine max* L. cv. Harosoy 63 wurde von Dr. V. Poysa (Agriculture Canada, Research Station, Harrow, Canada) erhalten; Samen der Sorte *Glycine max* L. cv. 9007 stammten von Pioneer Hi-Bred (Buxtehude).

2.1.16 *Phytophthora*-Kulturen

Kulturen des Oomyceten *Phytophthora sojae* Rasse 1 wurden von Dr. M. Gijzen (Agriculture Canada, Research Station, Harrow, Canada) bezogen.

2.1.17 Elicitor

Die Rohelicitorextraktion aus Zellwänden von *Phytophthora sojae* Rasse 1 erfolgte durch partielle Säurehydrolyse mit Trifluoressigsäure (Hahn et al., 1981; Sharp et al., 1984b).

2.1.18 Antikörper

Das gegen die 4CL aus Petersiliezellkultur (Ragg et al., 1981) gerichtete polyklonale Antiserum wurde von K. Hahlbrock (MPI für Züchtungsforschung; Köln) zur Verfügung gestellt. Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, wurde von Sigma (München) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration löslicher Proteine erfolgte mit Bio-Rad Reagenz nach Bradford (1976) mit BSA als Standard.

2.2.2 Stammhaltung der Zellsuspensionskultur von Sojabohne (*Glycine max* L. cv. Harosoy 63)

Die Kultivierung der Sojabohnenzellen erfolgte in 2 l Erlenmeyerkolben mit 400 ml B5-Medium (Gamborg et al., 1968, modifiziert nach Hahlbrock, 1975). Die Suspensionen wurden in einer Klimakammer bei 24°C und 110 Upm im Dunkeln geschüttelt.

Zur Stammhaltung wurden unter sterilen Bedingungen 20-25 ml der Zellsuspension in 400 ml neues Medium überführt, wenn die Leitfähigkeit des Mediums von 5,5 mS auf ca. 1,0 mS abgesunken war (ungefähr nach 7 d Wachstum).

2.2.3 Stammhaltung von *Phytophthora sojae*

Die Stammhaltung erfolgte in Plastik-Petrischalen auf Lima-Bean-Agar. Von einer mit *Phytophthora*-Mycel bewachsenen Agarplatte wurden aus der Randzone des Mycelrasens ca. 0,5 cm² Agar ausgestochen und zentral über Kopf auf eine neue Platte übertragen. Die beimpften Platten wurden bei 25°C im Dunkeln inkubiert und alle 3 Wochen erneut überimpft.

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinextrakte wurde das diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli (1970) angewandt. Bei Proteinkonzentrationen unter 2 mg x ml⁻¹ wurden die Proteine einer Methanolfällung unterzogen. Dazu wurden die Extrakte mit mindestens dem 3-fachen Volumen an -20°C kaltem Methanol versetzt und über Nacht bei -20°C oder zwei Stunden bei -80°C gelagert. Die ausgefallenen Proteine wurden anschließend 10 min bei 15000 x g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und der Niederschlag bei 90°C getrocknet. Die gefällten Proteine wurden in 20 µl Proteinladepuffer aufgenommen, für 5 min gekocht und anschließend auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Im Trenngel betrug die Acrylamid-Konzentration 10% (w/v), im Sammelgel 3% (w/v).

Die 0,75 mm dicken Gele hatten eine Größe von 8,1 cm x 5,5 cm. Bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA benötigte die Auftrennung der Proteine ca. 60 min. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt oder zur Immunodetektion auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

2.2.5 Proteintransfer und Immunodetektion

Die mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.4) aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Bei der angewandten „Semidry“-Methode erfolgte der Transfer bei Rt in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Westermeier, 1990) über 75 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran zur Markierung der Standardproteine 5 min mit Ponceau-S gefärbt und mit Aqua dest. wieder entfärbt. Vor dem immunologischen Nachweis mußten die unspezifischen Antikörper-bindestellen der Membran über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer abgesättigt werden. Anschließend wurde das gegen Petersilie-4CL gerichtete Antiserum (1:20000 in Inkubationspuffer verdünnt) für eine Stunde auf die Nitrocellulose gegeben. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) mit Waschpuffer wurde der sekundäre Antikörper - Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege gekoppelt mit alkalischer Phosphatase - für eine Stunde aufgetragen (1:20000 in Inkubationspuffer verdünnt). Durch erneutes dreimaliges Waschen (zweimal mit Waschpuffer, einmal mit TBS-Puffer) wurden nicht bindende Antikörper entfernt. Danach erfolgte ein optischer Nachweis der Immunreaktion durch Zugabe des Reaktionspuffers. Die Farbreaktion wurde durch Waschen der Membran mit Aqua dest. gestoppt.

2.2.6 Aufarbeitung von Sojabohnenzellkulturen und Sojabohnengeweben

Die Extraktion der 4CL wurde sowohl aus Zellkulturen als auch aus pflanzlichen Geweben nach der Vorschrift von Hille et al. (1982) mit leichten Modifikationen durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte bei 4°C. Drei Gramm gefrorene Zellen bzw. Pflanzengewebe wurden mit 3 g Seesand und 3 ml Extraktionspuffer 5 min gemörsert und anschließend mit Dowex 1x2 (0,15 g pro 1 g Zellen bzw. Gewebe) gerührt. Nachdem durch Zentrifugation bei 20000 x g die festen Bestandteile des Extraktes abgetrennt worden waren, wurden 2,5 ml des Überstandes über PD-10 Säulen nach Angaben der Hersteller entsalzt. Das Eluat wurde bei -20°C gelagert und diente der Bestimmung der 4CL-Aktivität.

2.2.7 Direkter spektralphotometrischer Enzymtest

Die Bestimmung der enzymatischen 4CL-Aktivität in den Enzymextrakten erfolgte mittels direktem spektralphotometrischen Test (Knobloch und Hahlbrock, 1975). Gemessen wurde hierbei die Extinktionszunahme durch die Bildung des Zimtsäure-CoA-Esters über einen Zeitraum von 10 min bei einer Reaktionstemperatur von 30°C. Die entsprechenden

Wellenlängen und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Zimtsäurederivate wurden von Gross und Zenk (1966) übernommen:

Zimtsäure	:	311 nm, $\epsilon = 22 \times 10^3 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$
4-Cumarsäure	:	333 nm, $\epsilon = 21 \times 10^3 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$
Kaffeesäure	:	346 nm, $\epsilon = 18 \times 10^3 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$
Ferulasäure	:	346 nm, $\epsilon = 19 \times 10^3 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$
Sinapinsäure	:	352 nm, $\epsilon = 20 \times 10^3 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$
3,4-DMZ	:	346 nm, $\epsilon = 24 \times 10^3 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$

1ml Testansatz enthielt:

50 μl 0,1 M MgCl_2

50 μl 10 mM Zimtsäurederivat

100 μl 50 mM ATP

550 μl bis 725 μl 0,2 M Tris/HCl pH 8,0

25 μl bis 200 μl Enzymextrakt (je nach Aktivität des Extraktes)

Der Testansatz wurde gemischt und 5 min inkubiert. Durch Zugabe von 50 μl 2 mM CoA wurde die Reaktion gestartet und die Extinktionszunahme über einen Zeitraum von 10 min alle 20 s gegen einen Blindwert ohne CoA verfolgt.

2.2.8 Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte der rekombinanten *Gm4CL*-Proteine

Zur Bestimmung der Substrataffinitäten der rekombinanten 4CL-Proteine wurden die unterschiedlich substituierten Zimtsäuren in Konzentrationen von 0,1-8 mM (Zimtsäure) oder 2,5-1000 μM (alle anderen Substrate) in den direkten spektralphotometrischen Enzymtest (Kapitel 2.2.7) eingesetzt. Die Ermittlung der Maximalgeschwindigkeits-Werte (V_{max}) und der Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) der rekombinanten *Gm4CL*-Isoformen erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes Sigma Plot, Version 5.0 mit der Regressionsgleichung für rechtwinklige Hyperbeln mit zwei Parametern. Für die Messungen wurde bakterieller Proteinrohextrakt eingesetzt.

Wurden zur Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte für unterschiedliche Substrate verschiedene Proteinextrakte einer 4CL-Isoform verwendet, so wurde für jeden Extrakt der Umsatz mit 500 μM 4-Cumarsäure bestimmt. Der gemessene Wert wurde jeweils als V_{max} -Wert für Cumarsäure zur Bestimmung des relativen V_{max} verwendet.

2.2.9 Abschätzung der Enzymaktivitäten von *Gm4CL1*, *Gm4CL2* und *Gm4CL3/4* für 4-Cumarsäure aus Protein-Rohextrakten

Um den relativen Anteil der 4CL-Isoenzyme am Gesamtumsatz an 4-Cumarsäure in Zellkultur- bzw. Pflanzenrohextrakten zu bestimmen, wurde die Gesamtaktivität der Extrakte bei jeweils 500 μM 3,4-Dimethoxyzimtsäure, Ferulasäure und 4-Cumarsäure bestimmt. Die Berechnungen beruhen auf den verschiedenen Substratspezifitäten der Sojabohne 4CL-Isoformen. 3,4-Dimethoxyzimtsäure kann nur von *Gm4CL1*, Ferulasäure nur von *Gm4CL1* und *Gm4CL2* und 4-Cumarsäure von allen Isoformen umgesetzt werden. Der schwache Ferulasäure-Umsatz von *Gm4CL3* (K_m : 3100 μM ; V_{\max} : 25% von 4-Cumarsäure) und *Gm4CL4* (K_m : 1800 μM ; V_{\max} : 35% von 4-Cumarsäure) wurde bei der eingesetzten Substratkonzentration von 500 μM vernachlässigt. Durch diese Berechnungen war es nicht möglich, zwischen *Gm4CL3* und *Gm4CL4* zu unterscheiden, da beide Isoformen die gleichen Substratspezifität besitzen. Die jeweiligen Aktivitäten der 4CL-Isoformen für 500 μM 4-Cumarsäure wurden, wie in Tabelle 3 gezeigt, abgeleitet. Die angewandten Multiplikationsfaktoren wurden nach Knobloch und Hahlbrock (1975) ermittelt (Tab. 4).

Tab. 3: Schema zur Ermittlung der *Gm4CL*-Isoform-Aktivitäten für 4-Cumarsäure.

Isoform	zu ermittelnde Substrataktivität	Berechnungsprozedur
<i>Gm4CL1</i>	Ferulasäure 4-Cumarsäure	0,6 x <i>Gm4CL1</i> -Aktivität für 3,4-Dimethoxyzimtsäure 1,1 x <i>Gm4CL1</i> -Aktivität für 3,4-Dimethoxyzimtsäure
<i>Gm4CL2</i>	Ferulasäure 4-Cumarsäure	Gesamtaktivität für Ferulasäure minus <i>Gm4CL1</i> -Aktivität für Ferulasäure 1,4 x <i>Gm4CL2</i> -Aktivität für Ferulasäure
<i>Gm4CL3/4</i>	4-Cumarsäure	Gesamtaktivität für 4-Cumarsäure minus <i>Gm4CL1</i> - and <i>Gm4CL2</i> -Aktivitäten für 4-Cumarsäure

Tab. 4: Ermittlung der Multiplikationsfaktoren.

Substrat	<i>Gm4CL1</i>	<i>Gm4CL2</i>
	V_{\max} (%)	V_{\max} (%)
4-Cumarsäure	100	100
Ferulasäure	56	71
3,4-Dimethoxyzimtsäure	89	

$0,6 \times$ 56 \rightarrow 89 \leftarrow $\times 1,1$

$1,4 \times$ 71 \rightarrow 100

Die rel. V_{\max} -Werte der *Gm4CL1* wurden von Knobloch und Hahlbrock (1975) übernommen, die rel. V_{\max} -Werte der *Gm4CL2* wurden von Möllers (1997) mit rekombinantem Protein bestimmt.

2.2.10 Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen aus Kulturstadium I und II

Um Sojabohnenzellkulturen vom Wachstumsstadium II ins Wachstumsstadium I (Hille et al., 1982) zu überführen, wurden 3 g Zellen aus Stadium II in 40 ml frisches B5-Medium überimpft. Nach eintägiger Inkubation (24°C, Dunkelheit, 110 Upm) befanden sich die umgesetzten Sojabohnenzellen im Stadium I. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml steriler Rohelicitorlösung (16 mg/ml = 6,4 mg Glucoseäquivalente/ml). Kontrollzellen wurden mit dem entsprechenden Volumen an sterilem Wasser behandelt. Für die Elicitierung von Sojabohnenzellen des Stadium II wurde eine 7 d alte Sojabohnestammkultur in 40 ml Fraktionen aufgeteilt, welche ebenso wie oben beschrieben induziert wurden. Zur Ernte der Sojabohnenzellen wurde das Medium über eine Glasfritte mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.11 Gewinnung von Zoosporen von *Phytophthora sojae*

Zur Zoosporenproduktion dienten 9 - 11 d alte Kulturen von *Phytophthora sojae* Rasse 1, die auf sehr dünn gegossenen Lima-Bean-Agarplatten angezogen wurden (10 ml/Petrischale mit 8,5 cm Durchmesser). Das Mycel wurde durch Auswaschen der Nährstoffe aus dem Substrat zur Bildung von Zoosporangien und zur Freisetzung der Zoosporen angeregt (Eye et al., 1978). Dazu wurden die Platten fünfmal mit je 30 ml sterilem Wasser überschichtet und dazwischen jeweils 30 min bei Rt inkubiert. Anschließend wurden die Petrischalen mit 10 ml Wasser überschichtet und üN bei Rt im Dunkeln inkubiert.

Die Sporensuspension wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in 50 ml Falcon-Gefäße überführt. Die Zoosporen wurden entweder durch Zentrifugation (2000 x g, 10 min, Rt) oder aufgrund ihres phototaktischen Verhaltens durch 20-minütige Beleuchtung von oben angereichert. Im Falle der Zentrifugation wurde pro Falcon-Gefäß bis auf 2 ml der gesamte Überstand verworfen. Die verbliebenen 2 ml dienten zum Resuspendieren der abzentrifugierten Zoosporen und Cysten.

Bei der phototaktischen Anreicherung befanden sich die Zoosporen fast quantitativ in den oberen 2 ml der Flüssigkeitssäule. Diese wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und vereinigt. Der Sporentiter wurde durch Auszählen der Zoosporen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.12 Anzucht von Sojabohnekeimlingen

Vor der Aussaat wurden die Samen für 10 min mit 10%iger Natriumhypochloridlösung oberflächensterilisiert und anschließend mit Wasser gründlich gewaschen. Die Anzucht der

Sojabohnekeimlinge erfolgte in Vermiculit unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierung wurde in einer Phytokammer bei 26°C mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit durchgeführt. Isolierte Gewebeteile wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Wurden Keimlinge für Wurzelinfektionsversuche angezogen, erfolgte die Kultivierung für drei Tage bei 26°C im Dunkeln.

2.2.13 Infektion von Sojabohnekeimlingen

Steril angezogene drei Tage alte Sojabohnekeimlinge (*Glycine max* L. cv. Harosoy 63) wurden durch Eintauchen der Wurzelspitzen in 1,5 ml Eppendorfgefäße mit 200 µl Zoosporensuspension (ca. 10⁴ Zoosporen) infiziert (Hahn et al., 1985). Kontrollbehandlungen wurden mit 200 µl sterilem Wasser durchgeführt. Während der Infektion wurden die Keimlinge bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Zur Ernte wurden die Keimwurzeln abgeschnitten, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Sofern nicht anders angegeben, wurden folgende Konzentrationen im PCR-Ansatz eingesetzt: 1 x *Taq* DNA-Polymerase Puffer, zusätzlich 0,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, jeweils 1 µM PCR-Primer, 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase und etwa 10 ng DNA-Template pro 10 µl Ansatz. Für Amplifikationsreaktionen mit *Pfu* DNA-Polymerase, welche die Fähigkeit zur Fehlerkorrektur besitzt, wurden 1 U *Pfu* DNA-Polymerase pro 10 µl Ansatz und 1 x *Pfu* DNA-Polymerase Puffer eingesetzt.

Bei der Auswahl von Oligonukleotidsequenzen, die als PCR-Primer eingesetzt werden sollten, wurden darauf geachtet, daß am 3'-Ende und am 5'-Ende eine G- oder C-Base war. Die Oligonukleotide hatten eine Länge von ca. 20 Basenpaaren und eine Schmelztemperatur von ca. 50°C (bestimmt mit dem Computerprogramm Oligoed).

Für ein typisches PCR-Protokoll mit *Taq* DNA-Polymerase zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von bis zu 1 kb wurden folgende Bedingungen gewählt: Denaturierungsphase von 2 min bei 94°C, 35 Zyklen mit einer Denaturierungsphase von 30 sec bei 94°C, einer Annealingphase von 30 s bei 50°C und Elongationsphase von 45 sec bei 72°C. Abschließend erfolgte nochmals eine 10 minütige Elongationsphase bei 72°C. Abweichungen von diesem Protokoll richteten sich hauptsächlich nach der Länge der DNA-Matrize, der Schmelztemperatur der Oligonukleotide und der verwendeten DNA-Polymerase (Elongationszeit der *Pfu* DNA-Polymerase: 1 kb pro 2 min) und sind entsprechend angegeben. Zur Einschränkung von unspezifischen Amplifikationen wurde für wichtige Reaktionen eine Hot-Start-PCR durchgeführt.

Zur schnellen Überprüfung von Transformanten wurde eine PCR direkt aus *E. coli*-Zellen durchgeführt. Dabei wurden Teile von Einzelkolonien direkt in das Reaktionsgefäß gegeben und die anfängliche Denaturierungsphase auf 4 min erhöht.

2.2.15 Ligationsreaktionen

Für Ligationsreaktionen wurden T4-DNA-Ligasen von Gibco/BRL oder Fermentas/MBI nach Herstellervorschrift verwendet. Für die Ligationen wurde ein Fragment:Vektor-Verhältnis von ca. 3:1 eingesetzt. Falls die Konzentrationen von Vektor und Fragment nicht bekannt waren, wurden die Mengen nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Gel abgeschätzt. Ein typischer Ligationsansatz enthielt 1 x Ligasepuffer, Vektor und Fragment in den entsprechenden Mengen und 1 U T4-DNA-Ligase pro 5 µl Ligationsvolumen, wovon 2 µl in die Transformation von Bakterienzellen eingesetzt wurden.

Die Ligationreaktionen wurden üblicherweise bei 4°C oder mit einem Temperaturzyklus zwischen 15°C und 30°C durchgeführt (100 Zyklen mit einer Temperaturänderung von 0,5°C/s). Ligationen mit glatten DNA-Enden wurden bei niedrigeren Temperaturen (4°C bis 15°C) und mit einem erhöhten Fragment:Vektor-Verhältnis (5:1) durchgeführt als Ligationen mit überhängenden DNA-Enden.

2.2.16 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.16.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution und Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem „Clean-a-Gene DNA Purification Kit“ in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nachdem die zu reinigenden DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten worden waren, wurde das Gewicht des Agarblocks bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von drei Gewichtsvolumen Bindungspuffer (enthält 6 M NaI) und das Auflösen der Agarose durch Erwärmen des Ansatzes (55°C, 5 min). Nach Zugabe von mindestens 5 µl Bindungsmatrix (1 µl bindet ca. 1 µg DNA) wurde die Probe für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Matrix-DNA-Komplex wurde abzentrifugiert (14000 x g, 7 s), der Überstand abgenommen, die Matrix in Waschpuffer vorsichtig resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt und der Waschpuffer anschließend gründlich entfernt. Die DNA-Fragmente wurden mit einem Matrixvolumen TE-Puffer oder Wasser durch Erwärmen auf 45°C (3 min) eluiert und nach Zentrifugation (14000 x g, 25 s) wurde der Überstand mit den gelösten DNA-Fragmenten

abgenommen. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Elution mit einem halben Matrixvolumen wiederholt. Qualität und Quantität der isolierten Fragmente wurde mittels Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.17.2) überprüft.

2.2.16.2 Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen erfolgte durch die alkalische Extraktion nach Birnboim und Doly (1979). Von einer 2 ml Bakterien-üN-Kultur wurden 1,5 ml in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 30 s in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich abgenommen, die Bakterien in 50 µl Lösung I resuspendiert (Vortex) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung II wurde der Ansatz durch mehrmaliges Umkippen gemischt und das Lysat für 5 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde 75 µl Lösung III zugegeben und der Ansatz nach sofortigem Mischen (Vortex) erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Ausgefällene genomische DNA und Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (18000 x g, 10 min, 4°C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und 100 µl Puffer-gesättigtem Phenol versetzt. Nach kurzem Mischen (Vortex) wurden die Phasen durch Zentrifugation (18000 x g, 5 min, Rt) getrennt und die obere, wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Ethanol wurden die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 min gefällt und durch 10-minütige Zentrifugation sedimentiert. Anschließend wurde der Niederschlag mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes bei 37°C getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in 50 µl TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert. Für Restriktionsanalysen wurden jeweils 2 µl eingesetzt. Zum Abbau der RNA wurde den Restriktionsansätzen RNase zugegeben. Plasmide für Mutationsansätze und Sequenzierungen wurden mit Hilfe eines Extraktions-Kit von Genomed nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.16.3 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA aus Sojabohnezellkulturen wurde nach der Methode von Draper und Scott (1988) mit einigen Veränderungen durchgeführt. Pro Extraktionsansatz wurden 3 g Sojabohnezellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser pulverisiert und in 15 ml DNA-Extraktionspuffer (56°C) resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min bei 56°C erfolgte eine Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die Phasentrennung konnte durch Zentrifugation (3500 x g, 1 h, Rt) erreicht werden. Anschließend wurde dem wässrigen Überstand 0,2 Vol CTAB-Lösung zugegeben, erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

extrahiert und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 0,75 Vol Isopropanol für 45 min bei Rt gefällt und durch Zentrifugation (6000 x g; 10 min, 4°C) sedimentiert. Nachdem der Niederschlag mit 75% Ethanol gewaschen worden war, wurden die Nukleinsäuren in 1 ml TE-Puffer gelöst und zum Abbau von RNA-Verunreinigungen für 1 h mit 20 µg RNase A behandelt. Zur Entfernung der RNase A wurde eine Extraktion mit TE-gesättigtem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA mit Isopropanol gefällt (30 min, Rt), sedimentiert (4400 x g, 5 min, Rt) und mit 75% Ethanol gewaschen. Die extrahierte DNA wurde in 200 µl TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels photometrischer Messungen. Die Qualität wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung von 5 µg extrahierter DNA in einem 0,6% igem Agarosegel überprüft.

2.2.16.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus Sojabohnenzellkulturen und pflanzlichen Geweben wurde nach der Methode von Chang et al. (1993) isoliert. Pro Ansatz wurden 2 - 3 g Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in 12 ml RNA-Extraktionspuffer (65°C) resuspendiert. Nach Inkubation von 10 - 20 min bei 65°C erfolgte eine zweimalige Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die Phasentrennung wurde jeweils durch Zentrifugation bei 3500 x g (10 min, Rt) erreicht. Anschließend wurde die RNA mit 2 M Lithiumchlorid üN bei 4°C gefällt und durch Zentrifugation (10000 x g, 20 min, 4°C) sedimentiert. Die RNA wurde in 500 µl SSTE-Puffer gelöst und einer weiteren Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion unterzogen. Durch Zusatz von 2,5 Vol Ethanol wurde die RNA erneut gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser gelöst.

Die Quantität der extrahierten RNA wurde durch photometrische Messungen bestimmt. Die Qualität der RNA wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung von 3 µg RNA, Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran (Kapitel 2.2.17.3) und anschließender Methylenblau-Färbung überprüft.

2.2.16.5 Isolierung von Poly(A)⁺-RNA

Zur Anreicherung von mRNA aus Gesamt-RNA wurde das „PolyATtract mRNA Isolation System“ von Promega verwendet. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA aus Sojabohnenzellkulturen des Wachstumsstadium II (Hille et al., 1982). Die Isolierung der mRNA wurde in zwei Parallelansätzen mit 740 µg bzw. 950 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Die RNA wurde in 500 µl Wasser aufgenommen und bei 65°C für 10 min denaturiert. Den Ansätzen wurden jeweils 150 pmol biotinylierte Oligo(dT)-Primer zugegeben, die mit der

Poly(A)-Region der mRNA bei 0,5 x SSC (10 min, Rt) hybridisierten. Anschließend erfolgte die Kopplung der Streptavidin-Magnetpartikeln an das Biotin bei Rt für 10 min. Nach vier Waschschritten mit 0,1 x SSC wurde die mRNA mit 0,4 ml Aqua dest. eluiert. Die Konzentration der isolierten mRNA wurde durch photometrische Messungen bei 260 nm bestimmt.

2.2.17 Gelelektrophoretische Auftrennung, Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren

2.2.17.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Die RNA-Gelelektrophorese erfolgte mit 1,2% Agarosegelen in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5) in einem rezirkulierendem System. Die Elektrophoresekammer wurde vor Gebrauch samt Zubehör für 1 h mit 0,1 N NaOH Lösung behandelt, um eventuell vorhandene RNasen zu inaktivieren. Vor dem Lauf wurde die RNA mit 1M Glyoxal für 30 min bei 50°C denaturiert. Nach Abkühlung des Ansatzes auf Eis und Zugabe von 0,1 Vol RNA-Probenpuffer erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung bei einer Stromstärke von 40 mA (2 h). Während der Auftrennung wurde mit einer Umwälzpumpe der Laufpuffer zwischen Anode und Kathode zirkuliert, um die Ausbildung eines pH-Gradienten im Puffer zu verhindern.

2.2.17.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde Agarose als Trägermaterial verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,6%ige (1-20 kb), 0,8%ige (0,5-7 kb) oder 2,0%ige (0,1-2 kb) Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer wurde Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer benutzt, dem zur späteren Detektion der Nukleinsäuren Ethidiumbromid (10 µg pro 100 ml Laufpuffer) zugesetzt wurde. Die DNA-Proben wurden in 1 x Ladepuffer aufgetragen und bei einer Stromstärke von 40-60 mA aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine 1kb-Leiter.

2.2.17.3 Transfer von Nukleinsäuren

Die Übertragung von Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot in 20 x SSC nach Sambrook et al. (1989). Hierbei wurde die Transfer-Lösung (20 x SSC) aus

einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papiertücher gesaugt. Die Nukleinsäuren wurden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und an der darüberliegenden Nylonmembran gebunden. DNA-Fragmente wurden vor dem Transfer denaturiert, um für die anschließende Hybridisierung einzelsträngig zur Verfügung zu stehen. Dazu wurde das Gel 2 x 20 min in Denaturierungslösung und 2 x 20 min Neutralisierungslösung geschwenkt. Nach dem Transfer wurden die Nukleinsäuren durch Backen (20 min, 80°C) auf der Membran fixiert und im Falle von übertragener RNA zusätzlich mit UV-Licht (UV-Crosslinker; 700 Watt) immobilisiert.

2.2.17.4 Übertragung bakterieller Nukleinsäuren auf Nitrocellulosemembran

Bakterienkolonien wurden zur Vereinzelnung mit einem Zahnstocher auf eine LB-Agarplatte mit vorgegebenem Raster übertragen und für ca. 12 h bei 37°C inkubiert. Durch Auflegen einer trockenen Nitrocellulosemembran für 20 s auf die vorgekühlte (1 h, 4°C) Bakterienplatte erfolgte die Übertragung der Bakterien auf die Nitrocellulose. Danach wurden die übertragenen Bakterien durch Inkubation (3 min) der Membran auf einem mit 10%iger SDS-Lösung gesättigtem Filterpapier lysiert. Die DNA-Denaturierung der lysierten Bakterien erfolgte durch Inkubation (5 min) der Membran auf einem mit DNA-Denaturierungslösung gesättigtem Filterpapier. Zur Neutralisierung wurde die Membran für weitere 5 min auf einem mit DNA-Neutralisierungslösung gesättigtem Filterpapier aufgelegt. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und zur Fixierung der DNA auf der Membran für 15 min bei 80°C gebacken. Bei allen Behandlungsschritten wurde die Nitrocellulosemembran mit der Seite nach oben inkubiert, auf die die Bakterien übertragen wurden.

2.2.18 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden wurde mit dem „Prime-a-Gene Labeling System“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Denaturierung von 25-50 ng der zu markierenden DNA (2 min, 95°C) zu Einzelsträngen, erfolgte die Anlagerung der Hexanukleotid-Primer und die Synthese des Komplementärstranges unter Einbau von [α -³²P]dCTP (eingesetzte Radioaktivität: 740 kBq) für 15-50 min bei Raumtemperatur. Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend mittels Gelfiltrationschromatographie an S-200 Mikrospin-Säulen abgetrennt. Bei einer Einbaurrate des radioaktiven Nukleotids von 30-60% betrug die Gesamtaktivität eines Ansatzes zwischen 1×10^7 und $2,5 \times 10^7$ cpm.

2.2.19 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Nitrocellulose- und Nylonmembranen mit übertragenen Nukleinsäuren wurden für mindestens 6 h bei 42°C mit Hybridisierungspuffer inkubiert. Nach Zugabe der α -³²P-markierten Sonde (ca. 3×10^6 cpm/ml Hybridisierungspuffer) erfolgte die Hybridisierung bei 42°C über Nacht. Nachdem die Membranen zweimal in 2 x SSC, 0,1% SDS geschwenkt wurden, erfolgte die Entfernung unspezifisch gebundener Sonden durch unterschiedlich stringente Waschungen. Bei der Verwendung von heterologen Sonden wurde mit 1 x SSC, 0,1% SDS bei 42°C für 2 x 20 min gewaschen (niedere Stringenz), während beim Einsatz von homologen Sonden mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 65°C für 30 min gewaschen wurde (hohe Stringenz). Um das SDS zu entfernen, wurde ein letzter Waschschrift in 1 x SSC durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Membranen entweder bei -80°C auf einem Röntgenfilm oder bei Rt auf einer Bildplatte exponiert. Die Strahlungssignale auf der Bildplatte wurde mit Hilfe eines Phosphoimagers sichtbar gemacht. Hybridisierte Sonden wurden mit 0,1% SDS und 5 mM EDTA bei 95°C (20 min) entfernt.

2.2.20 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA wurde nach der Didesoxykettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) mit einem Sequenase-Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. In die Markierungsreaktion wurden 185 kBq [α -³⁵S]dATP eingesetzt. Die markierten DNA-Fragmente wurden mittels 5%iger denaturierender Polyacrylamidgele aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit einer Macrophor-Sequenzierapparatur durchgeführt. Nach anschließender Fixierung (20 min in 10% Essigsäure; 20% Methanol) wurden die Gele bei 80°C für 30 min getrocknet und auf einem Röntgenfilm für 24 h bei Rt exponiert.

Im Verlauf der Arbeit wurde zudem ein Großteil der Sequenzierungen in Auftrag gegeben (Seqlab, Martinsried; Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann, Botanisches Institut, LMU München).

2.2.21 Phylogenetische Analyse

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen wurde mit CLUSTAL W 2.0 (Thompson et al., 1994) durchgeführt und per Hand korrigiert. Die phylogenetische Analyse des Sequenzvergleichs erfolgte mit PAUP 4.0 (Swofford, 1998). Die Länge der Aminosäuresequenzen variierte zwischen 535 (*P. tremuloides* 4CL1) und 636 Aminosäuren (*L. erythrorhizon* 4CL1). Für die phylogenetische Analyse wurden die überhängenden

Aminosäuren entfernt. Es wurde eine heuristische „maximum parsimony“-Analyse unter folgenden Bedingungen durchgeführt: RANDOM addition (10 Wiederholungen), TBR branch-swapping, MULPARS, STEEPEST DESCENT, COLLAPSE und ACCTRAN optimization. „Bootstrap“-Werte (Felsenstein, 1985) wurden durch 1000 Wiederholungen bestimmt.

2.2.22 Klonierung der *Gm4CL1*-cDNA

2.2.22.1 Ableitung von degenerierten Oligonukleotidsequenzen

Degenerierte Oligonukleotidsequenzen wurden von den Peptiden S1 ([K]GYLNDPEA) und S2 ([K]ARLVLTQSAYVEK) abgeleitet. Vom N-terminalen Peptid (GPSPQ/REIIL) wurde die abgeleitete Basensequenz nur für die Aminosäuren Q/REIIL bestimmt. Außerdem wurde die Aminosäuresequenz R/KSKLP/QDI mit in die Ableitung der N-terminalen Oligonukleotidsequenzen einbezogen, da dieses Sequenzmotiv direkt dem sequenzierten N-Terminus folgte und bei allen bisher bekannten 4CL-Isoformen konserviert war. Das resultierende Peptid Q/REILR/KSKLP/QDI wurde als Peptid S3 bezeichnet.

A) Ableitung der Oligonukleotidsequenz für das Peptid *Gm4CL1*-S1.

<i>Nt4CL1</i>	ATGAAAGGTTACCTGAATGATCCCGAGGCC
<i>Nt4CL2</i>	401 M K G Y L N D P E A 410 ATGAAAGGCTACCTGAATGATCCAGAGGCC
<i>Pt4CL1</i>	396 M K G Y L N D P E A 405 ATGAAAGGATATATTAACGACCCGGAATCC
<i>At4CL1</i>	396 M K G Y I N D P E S 405 ATGAAAGGTTACCTCAACAATCCGGCAGCT
<i>Le4CL1</i>	417 M K G Y L N N P A A 426 ATGAAAGGTTATCTGAACGATCCCGAGGCG
<i>Le4CL2</i>	399 M K G Y L N D P E A 408 ATGAAAGGCTATCTCAACGACCCCGAGGCA
<i>Pc4CL1</i>	438 M K G Y L N D P E A 447 ATGAAAGGCTACCTCAATGATCCTGAATCA
<i>Os4CL1</i>	397 M K G Y L N D P E S 406 ATGAAAGGTTACCTGAACAACCCAGAGGCC
<i>St4CL1</i>	416 M K G Y L N N P E A 425 ATGAAAGGTTACTTGAATGATCCCGAGGCC
<i>Gm4CL2</i>	399 M K G Y L N D P E A 408 ATGAAAGGTTATCTAAATGATGGAGAGGCT
<i>Gm4CL3</i>	400 M K G Y L N D G E A 409 ATGAAAGGATATCTGAACGATGAGAAAGCG 422 M K G Y L N D E K A 431

S1-Aminosäuresequenz	M K G Y L N D P E A																											
S1-Nukleotidsequenz	5'-ATGAAAGGATACCTGAACGATCCGGAGGCG-3'																											
	<table border="0"> <tr> <td>G</td><td>T</td><td>TT</td><td>A</td><td>T</td><td>C</td><td>A</td><td>A</td><td>T</td> </tr> <tr> <td></td><td>C</td><td></td><td>C</td><td></td><td></td><td>C</td><td></td><td>A</td> </tr> <tr> <td></td><td>G</td><td></td><td>T</td><td></td><td></td><td>T</td><td></td><td>C</td> </tr> </table>	G	T	TT	A	T	C	A	A	T		C		C			C		A		G		T			T		C
G	T	TT	A	T	C	A	A	T																				
	C		C			C		A																				
	G		T			T		C																				
Komplementärstrang der S1-Nukleotidsequenz	3'-TACTTTCCCTATGGACTTGCTAGGCCTCCGC-5'																											
	<table border="0"> <tr> <td>G</td><td>A</td><td>AA</td><td>T</td><td>A</td><td>G</td><td>T</td><td>T</td><td>A</td> </tr> <tr> <td></td><td>G</td><td></td><td>G</td><td></td><td></td><td>G</td><td></td><td>T</td> </tr> <tr> <td></td><td>C</td><td></td><td>A</td><td></td><td></td><td>A</td><td></td><td>G</td> </tr> </table>	G	A	AA	T	A	G	T	T	A		G		G			G		T		C		A			A		G
G	A	AA	T	A	G	T	T	A																				
	G		G			G		T																				
	C		A			A		G																				

4CL1-S1	3'-TACTTTCCDATRGANTTRCTRGGYCT-5'
---------	----------------------------------

B) Ableitung der Oligonukleotidsequenz für das Peptid *Gm4CL1-S2*.

<i>Nt4CL1</i>		AGTGCTAAGATTATTATAACTCAATCGTGCTTTGTGGGCAAA	
<i>Nt4CL2</i>	129	S A K I I I T Q S C F V G K	142
		AGTGCTAAGATCATTGTACACAAGCGTGTTCATGTTAACAAA	
<i>Pt4CL1</i>	124	S A K I I V T Q A C H V N K	137
		GGCGCGCGCATCATAGTTACCCGTGGCAGCTTATGTTGAGAAA	
<i>At4CL1</i>	124	G A R I I V T L A A A Y V E K	137
		AACACCAAATCATAATCACCGAAGCTCGTTACGTCGACAAA	
<i>Le4CL1</i>	137	N T K L I I T E A R Y V D K	150
		AAAACAAAGTTCATCATCACAGTATCCACCCTGTCCCAAAA	
<i>Le4CL2</i>	126	K T K L I I T V S T T V P K	139
		AACACAAAATCATTACTCAATCCAACCTACGTTGACAAG	
<i>Pc4CL1</i>	155	N T K L I I T Q S N Y V D K	168
		CAAGCTAAGTTCATAATTACGCAAGCTTGTTCAGTAGACAAA	
<i>Os4CL1</i>	125	Q A K L I I T Q A C Y V D K	138
		GGCGCCACCGTCGTCATCACCGAGTCCATGGCCGCCGACAAG	
<i>St4CL1</i>	138	G A T V I T E S M A A D K	151
		AGTGCTAAGATTGTTATCACGCAAGCTTGTTTTTCGGGGAAA	
<i>Gm4CL2</i>	127	S A K I V I T Q A C F A G K	140
		AATGCCAAGTTCCTCATCACCCAGGCCTCTTACTACGACAAA	
<i>Gm4CL3</i>	124	N A K L L I T Q A S Y Y D K	137
		AAGACGAAGCTGATCATAACGCAGGCAATGTACGTGGACAAG	
	146	K T K L I I T Q A M Y V D K	159

S2-Aminosäuresequenz

S2-Nukleotidsequenz

K A R L V L T Q S A Y V E K
 AATGCGCGGCTCGTCC**TCACCCAGTCCGCTTACGTGGAAAAA**-3`
 GGC CA CT G GT **G G AAG G T C G G**
 C T A A A T **A A A A T**
 G T T T T C A

4CL1-S2

5`-TBACNCARTCNGCNTAYGTBGARAA-3`

C) Ableitung der Oligonukleotidsequenz für das Peptid *Gm4CL1-S3*.

<i>Nt4CL1</i>		GGAGATTTAATTTTCCGATCAAAACTCCCTGATATT	
<i>Nt4CL2</i>	13	G D L I F R S K L P D I	24
		GTTGACATAATTTTCCGATCAAAACTCCCTGATATT	
<i>Pt4CL1</i>	8	V D I I F R S K L P D I	19
		GTGAGCATCTGTACAGATCGAAGCTTCCCGATATC	
<i>At4CL1</i>	8	V E H L Y R S K L P D I	19
		AGTGACGTCATTTTCCGATCAAAGTTACCGGATATT	
<i>Le4CL1</i>	21	S D V I F R S K L P D I	32
		AAAGACATAATCTTCAGATCAAAACTCCCTGATATA	
<i>Le4CL2</i>	10	K D I I F R S K L P D I	21
		GAAACCATCATCTTCAGATCCAAACTACCTGATATA	
<i>Pc4CL1</i>	39	E T I I F R S K L P D I	50
		GAAGACCTTATTTTCCGATCGAAACTCCCTGATATT	
<i>Os4CL1</i>	9	E D L I F R S K L P D I	20
		CCGGAGATCATCTTCCGGTTCGAAGCTGCAAGACATC	
<i>St4CL1</i>	20	P E I I F R S K L Q D I	31
		GGAGATTTAATCTTTTCGATCTAAACTCCCTGATATT	
<i>Gm4CL2</i>	11	G D L I F R S K L P D I	22
		AGGGAATTGATATTACGGTTCGAAGCTTCCGGATATC	
<i>Gm4CL3</i>	8	R E L I F R S K L P D I	19
		ACTAGCCATGTCTTCAAATCAAATACCAGATATC	
	30	T S H V F K S K L P D I	41

S3-Aminosäuresequenz

S3-Nukleotidsequenz

Q/R E I I L R/K S K L P/Q D I
 5`-CAT**GAAATCATCTCAGATCGAAACT**ACCAGATATC-3`
 GG **G T AT ACAG A GT** T G C T
 A **A T G** C A
 C

4CL1-S3

5`-GARATHATHYTVMRRTCRAARYT-3`

Abb. 5: Ableitung der degenerierten Oligonukleotidsequenzen für die Peptide *Gm4CL1-S1* (A), *Gm4CL1-S2* (B) und *Gm4CL1-S3* (C).

Die Abbildungen A) bis C) zeigen einen Vergleich der zu den Peptiden S1, S2 und S3 der *Gm4CL1* homologen Aminosäuresequenzen einiger 4CL-Isoformen und deren Nukleotidsequenzen. Ferner sind die abgeleiteten Basensequenzen der *Gm4CL1*-Peptide dargestellt. Die für die Oligonukleotid-Primersequenz verwendeten Bereiche des Komplementärstranges der S1-Basensequenz (A), der S2-Basensequenz (B) und der S3-Basensequenz (C) sind dick gedruckt. Kursiv sind die Basen an den degenerierten Positionen dargestellt, die für die Primerherstellung nicht berücksichtigt wurden, da sie bei den bekannten 4CL-Basensequenzen an diesen Positionen selten oder überhaupt nicht auftraten. Die resultierenden Primersequenzen 4CL1-S1 (A), 4CL1-S2 (B) und 4CL1-S3 (C) sind in den Kästen gezeigt.

Am 5'-Ende der S1-Nukleotidsequenz wurde das Methionincodon (ATG) ergänzt, da diese Aminosäure bei allen bisher bekannten 4CLs an dieser Position hochkonserviert ist. Mit Ausnahme von Methionin und Tryptophan werden alle Aminosäuren von mehreren Basentriplets codiert, so daß es nicht möglich ist, von der Aminosäuresequenz eines Peptids die exakte codierende Basensequenz abzuleiten. Um möglichst wenig degenerierte Oligonukleotide zu erhalten, wurden die den Peptiden S1, S2 und S3 entsprechenden kodierenden Regionen einiger bekannter 4CL-cDNAs verglichen. Dadurch wurde ermittelt, welche Nukleotide an den degenerierten Positionen für die Aminosäurecodierung der 4CLs bevorzugt werden (Abb. 5). Die Basenabfolge des Peptids S3 und des Peptids S2 wurde vom kodierenden cDNA-Strang abgeleitet, während die Basensequenz des Peptids S1 vom Komplementärstrang stammte. Für die PCR wurden die abgeleiteten degenerierten Oligonukleotide in folgenden Kombinationen eingesetzt: 4CL1-S2/4CL1-S1 und 4CL1-S3/4CL1-S1.

2.2.22.2 Amplifizierung einer *Gm4CL1*-Sonde

Die Reverse Transkription (RT) von RNA wurde mit der MMuLV-RTase (Moloney Murine Leukaemia Virus) durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg Gesamt-RNA aus nicht-elicitierten Sojabohnezellkulturen aus Wachstumsstadium II für 5 min bei 65°C und für 3 min bei 90°C denaturiert. Nach Abkühlung des Ansatzes (5 min, 4°C) erfolgte die Zugabe von 1 x RT-Puffer, 1 mM dNTPs, 200 U MMuLV-RTase, 4 U RNAsin und 40 ng Random Primer bei einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Die RT der RNA wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 15 min 25°C (Primer-Anlagerung); 90 min 37°C (cDNA-Synthese); 5 min 90°C (RT-Denaturierung).

In der nachfolgenden PCR-Amplifikation (RT-PCR) wurde die synthetisierte cDNA in einer 1:5-Verdünnung zusammen mit 2 mM MgCl₂, 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase und je 10 pmol Primer 4CL1-S1 und 4CL1-S2 in einem 10 µl-Ansatz eingesetzt. Für die DNA-Amplifizierung wurde das PCR-Programm P1 (Anhang A1) eingesetzt. Das resultierende ca.

850 bp lange *Gm4CL1-S1/S2*-PCR-Fragment wurde im pGEM-T-Vektor in *E. coli* JM109 kloniert (pGEM-T/*Gm4CL1-S1/S2*) und diente zum Durchmustern einer cDNA-Bank.

2.2.22.3 Herstellung einer cDNA-Bank

Die Synthese, Größenfraktionierung und Ligation der cDNA in λ ZIPLOX/*NotI/SalI*-Arme wurde mit dem „SuperScript Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning“ nach Angaben des Herstellers mit leichten Veränderungen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten 7 μ g Poly(A)⁺-RNA, die aus Sojabohnenzellkulturen des Wachstumsstadiums II (Hille et al., 1982) isoliert wurden. Für die Synthese des cDNA-Erststrangs diente ein *NotI*-Adapter-Primer als Initiationsstelle. Der anschließenden Zweitstrangsynthese folgte die Ligation von *SalI*-Linkern an die cDNA-Enden. Nach *NotI*-Restriktion lag die cDNA mit einem 5′-*SalI*-Linker und einer 3′-*NotI*-Schnittstelle vor. Da die cDNA-Synthese ohne radioaktive Markierung durchgeführt wurde, wurden bei der säulenchromatographischen Größenfraktionierung die Elutionsfraktionen von 350 μ l bis 550 μ l in Anlehnung an das Syntheseprotokoll vereinigt. In diesen Fraktionen wurden erfahrungsgemäß die längeren cDNAs eluiert, während die nicht eingebauten Nukleotide, *NotI*-Adapter-Primer und *SalI*-Linker noch auf der Säule verblieben. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde mittels PCR mit 4CL1-S1 und 4CL1-S2 als Primer überprüft (PCR-Programm P1, Anhang A1). Für die anschließende Ligation der cDNA in λ ZIPLOX/*NotI/SalI*-Arme wurde ein Fünftel des Eluats eingesetzt.

Die *in-vitro*-Verpackung der ligierten cDNA wurde mit dem Verpackungssystem „Packagene Lambda DNA Packaging System“ nach Herstellervorschrift durchgeführt.

Der gesamte Ligationsansatz (5 μ l) wurde mit 25 μ l Verpackungsextrakt für 3 h bei 22°C inkubiert und anschließend mit SM-Phagenpuffer auf 250 μ l aufgefüllt. Zur Bestimmung des Phagentiters wurden jeweils 100 μ l *E. coli* Y1090 Bakteriensuspension ($OD_{600nm} > 0,6$) mit je 100 μ l verdünnter Phagensuspension (1:10², 1:10³, 1:10⁴) für 20 min bei 37°C inkubiert (Adhäsion). Nach Zugabe von 4 ml 45°C warmen Weichagar wurde der Ansatz auf L-Agar ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Nach Auszählung der Phagenplaques wurde ein Titer von $2,8 \times 10^5$ pfu/ml bestimmt.

Zur Bestimmung des Anteils der rekombinanten Phagen wurden 100 μ l einer *E. coli* DH10B Bakteriensuspension mit 25 μ l Phagensuspension (1:25 Verdünnung) für 15 min bei Rt infiziert. Der gesamte Ansatz wurden auf L_{amp}/X-Gal/IPTG-Agarplatten plattiert und üN bei 37°C inkubiert. Der Bakterienstamm DH10B wird von den Phagen nicht lysiert, sondern schneidet das im Phagen genom integrierte Plasmid pZL1 samt eventuell inserierter cDNA aus. Der Anteil an rekombinanten Plasmiden (entspricht dem Anteil an rekombinanten Phagen) wurde mittels blau-weiß-Selektion ermittelt. In der Phagensuspension betrug der Anteil an rekombinanten Phagen ca. 70%.

2.2.22.4 Durchmustern einer cDNA-Bank

Pro Ansatz wurden jeweils 10 µl Phagensuspension mit ca. 2000 pfu in 90 µl SM-Phagenpuffer verdünnt. Der zu infizierende *E. coli*-Stamm Y1090 wurde in L_{maltose}-Medium bis zu einer OD_{600nm} > 0,6 kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation von jeweils 100 µl Bakteriensuspension mit 100 µl Phagensuspension für 20 min bei 37°C. Nach Zugabe von 4 ml 45°C warmen Weichagar wurde der Ansatz auf L-Agar ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Nachdem die Phagenplatten für mindestens eine Stunde bei 4°C gekühlt wurden, wurde ein Nitrocellulosemembran (gesättigt mit 1M NaCl-Lösung) für 2 min aufgelegt und seine Lage markiert. DNA-Denaturierung, Neutralisierung, Waschen der Membran und Fixierung der DNA wurde ebenso wie in Kapitel 2.2.17.4 beschrieben durchgeführt.

Die Nitrocellulosemembran mit Phagen-DNA wurden wie in Kapitel 2.2.19 beschrieben bei niedriger Stringenz mit dem PCR-Fragment *Gm4CL1-S1/S2* als Sonde hybridisiert. Phagen, deren DNA mit der Sonde kreuzhybridisierte, konnten aufgrund der durchgeführten Lagemarkierung der Nitrocellulosemembran auf den Phagenplatten identifiziert werden. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurden die positiven Phagenplaques ausgestochen und in 500 µl SM-Phagenpuffer mit 25 µl Chloroform resuspendiert. Zur Vereinzelnung wurden die Phagen 1:10³, 1:10⁴ und 1:10⁵ in SM-Puffer verdünnt und jeweils 100 µl zur erneuten Infektion von *E. coli* Y1090 eingesetzt. Bakterieninfektion, Übertragung der Phagen auf Nitrocellulosemembran und Membran-Hybridisierung wurden nochmals wie oben beschrieben durchgeführt.

Positive Phagenplaques wurden aus den Agarplatten ausgestochen, in 250 µl SM-Puffer mit 12,5 µl Chloroform resuspendiert (10 s, Vortex) und 5 min bei Rt inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer üN-Kultur von *E. coli* DH10B mit 25 µl der Phagensuspension für 5 min bei Rt infiziert. Der gesamte Ansatz wurden auf L_{amp/X-Gal/IPTG}-Agarplatten plattiert und üN bei 37°C inkubiert. Bakterien von weißen Kolonien enthalten den aus dem Phagen-Genom ausgeschnittenen Vektor pZL1 mit der inserierten cDNA.

2.2.22.5 Synthese und Amplifikation von 5'-cDNA-Enden

Die Synthese und Amplifikation fehlender 5'-cDNA-Enden wurde mit dem "5'-RACE System" nach dem Protokoll des Herstellers mit leichten Modifikationen durchgeführt. Zur Herstellung der Erststrang-cDNA durch die SUPERScript II RTase wurden 1 µg Poly(A)⁺-RNA aus nicht-elicitierten Sojabohnenzellkulturen (*Gm4CL1*) bzw. 1 µg Gesamt-RNA aus 4 h induzierten Sojabohnenzellkulturen (*Gm4CL4*) und 50 pmol genspezifischer Primer 1 (GSP1) in die Synthese-Reaktion eingesetzt. Nach Inkubation bei 42°C für 45 min wurde die SUPERScript II RTase Hitze-inaktiviert und nicht eingebaute Nukleotide mittels S-200 Mikrospin-Säulen abgetrennt. Durch anschließende Inkubation mit RNase H erfolgte der

spezifische Abbau der RNA aus dem RNA/DNA-Hybrid. Danach wurde an das 3'-Ende der Erststrang-cDNA mittels terminaler Desoxynukleotidtransferase eine Poly-C-Ankersequenz synthetisiert. Für die nachfolgende PCR zur Amplifizierung des 5'-Endes wurde ein Ankerprimer, der komplementär an die synthetisierte Poly-C-Ankersequenz hybridisierte, und ein zweiter genspezifischer Primer (GSP2) eingesetzt. Die Amplifizierung wurde in einem 15 µl-Ansatz mit 1 U *Taq* DNA-Polymerase, Anker-Primer, GSP2 und 1,5 µl Erststrang-cDNA mit Poly-C-Anker durchgeführt. Für die Amplifizierung der 5'-Enden der *Gm4CL1* und *Gm4CL4* wurden verschiedene PCR-Protokolle ausgearbeitet.

Mit dem PCR-Programm P2 (Anhang A1) konnte das 5'-Ende der *Gm4CL1* amplifiziert werden. Die Ligation des 5'-RACE-Produktes in den Vektor pSPORT erfolgte über eine *SalI*-Schnittstelle, die Bestandteil des Ankerprimers war, und eine sequenzinterne *SalI*-Schnittstelle (pSPORT/*Gm4CL1*-5'). Die Identifizierung der rekombinanten Plasmide erfolgte durch *SalI*-Restriktion der Plasmide, gelelektrophoretische Auftrennung und Übertragung der Fragmente auf eine Nylonmembran und anschließende Southern Blot-Hybridisierung mit dem bereits isolierten Teil der *Gm4CL1*-cDNA als Sonde. Kreuzhybridisierende Fragmente wurden durch Sequenzierung mit dem Sequenzierprimer Seq1 überprüft.

Zur Amplifikation des 5'-Endes der *Gm4CL4* erfolgte mit Hilfe des PCR-Programms P3 (Anhang A1). Die 5'-RACE-Produkte wurden in Vektor pGEM-T kloniert (pGEM-T/*Gm4CL4*-5'), mittels *SalI*-, *EcoRV*- und *HindIII*-Restriktionen analysiert und mit 4CL4-GSP2 bzw. 4CL4-LISS als Sequenzierprimer sequenziert.

2.2.23 Eliminierung des Startcodons der *Gm4CL1* und *Gm4CL4* und Ligation der modifizierten cDNA-Sequenzen in den Expressionsvektor pQE-30

Das Startcodon des *Gm4CL1*-5'-RACE-Fragmentes wurde mittels PCR entfernt, um sicherzustellen, daß bei der Transkription das vektoreigene Startcodon benutzt wird. Mit 4CL1-*KpnI* und Seq1 als Primer und pSPORT/*Gm4CL1*-5' als DNA-Matrize wurde die PCR mit *Taq* DNA-Polymerase unter den Bedingungen des PCR-Programms P4 (Anhang A1) durchgeführt. Die Verwendung des PCR-Primer 4CL1-*KpnI* führte zur Eliminierung des Startcodons und zugleich zur Einführung einer *KpnI*-Schnittstelle. Die Modifizierung wurde durch Sequenzierung des amplifizierten Fragmentes überprüft. Das modifizierte 5'-Ende wurde mit dem bereits vorhandenen Teil der *Gm4CL1*-cDNA (pZL1/*Gm4CL1*-3') über eine gemeinsame *SalI*-Restriktionsschnittstelle und die eingeführte *KpnI*-Restriktionsschnittstelle im pZL1-Vektor verknüpft (pZL1/*Gm4CL1*-*KpnI*). Für die Expression wurde die *Gm4CL1*-cDNA über *KpnI* und *HindIII* im richtigen Leserahmen in den Expressionsvektor pQE-30 inseriert (pQE-30/*Gm4CL1*-*KpnI*).

Das Startcodon der *Gm4CL4* wurde mittels PCR mit *Pfu* DNA-Polymerase und 4CL4-*SphI* und 4CL4-GSP2 als Primer eliminiert. Das Plasmid pGEM-T/*Gm4CL4*-5' diente hierbei als Amplifikationsvorlage. Die PCR erfolgte nach den Bedingungen des PCR-Programms P5 (Anhang A1). Zur Vervollständigung der *Gm4CL4*-cDNA wurde das modifizierte 5'-RACE-Produkt über die Restriktionsschnittstellen *SphI* und *SalI* in den Vektor pTZ19R/*Gm4CL16* (Uhlmann und Ebel, 1993) ligiert (pTZ19R/*Gm4CL4*-*SphI*). Für die Klonierung der *Gm4CL4* in den Expressionsvektor pQE-30 wurde deren offener Leserahmen von pTZ19R/*Gm4CL4*-*SphI* mit 4CL4-*SphI* und 4CL3-*HindIII*-Reverse als PCR-Primer amplifiziert. Die *Pfu* DNA-Polymerase wurde unter den Bedingungen des PCR-Programms P6 (Anhang A1) eingesetzt. Über die Restriktionsschnittstellen *SphI* und *HindIII* wurde die amplifizierte cDNA-Sequenz der *Gm4CL4* in pQE-30 kloniert (pQE-30/*Gm4CL4*).

Die Herstellung einer aktiven *Gm4CL1* war anfangs nicht möglich. Es stellte sich später heraus, daß die inaktive *Gm4CL1* durch einen Klonierungsfehler zustande kam, der sich bei der Herstellung von pQE-30/*Gm4CL1* ereignete. Daher wurde eine alternative Isolierung der *Gm4CL1*-cDNA durchgeführt. Nach RT von 1 µg Gesamt-RNA aus nicht-induzierten Sojabohnenzellkulturen (Kapitel 2.2.22.2) erfolgte die Amplifizierung des offenen Leserahmens der *Gm4CL1*-cDNA mit 4CL1-*KpnI* und 4CL1-*HindIII*-Reverse als PCR-Primer. Die RT-PCR wurde mit *Pfu* DNA-Polymerase unter den Bedingungen des PCR-Programms P7 (Anhang A1) durchgeführt. Die amplifizierte *Gm4CL1*-cDNA wurde über *KpnI* und *HindIII* in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-30 ligiert (pQE-30/*Gm4CL1*). Sequenzanalysen zeigten, daß zwischen der neu hergestellten und der ursprünglich isolierten *Gm4CL1* ein Aminosäureunterschied innerhalb eines hochkonservierten Motivs (AS393; Box II) vorlag. Die ursprünglich isolierte Form trägt an dieser Stelle wie alle 4CLs ein Arginin, während die neue isolierte Form hier ein Isoleucin aufwies. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Versuche mit der Isoleucin-Form durchgeführt.

2.2.24 Klonierung der *Gm4CL3* in den Expressionsvektor pQE-31

Die *Gm4CL3*-cDNA wurde mit *EcoRI* aus dem Vektor pHisTrcB/*Gm4CL3* (Möllers, 1997) ausgeschnitten und die 5'-Überhänge wurden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt. Die Ligation der *Gm4CL3*-cDNA erfolgte in den *SmaI*-geschnittenen pQE-31 Expressionsvektor (pQE-30/*Gm4CL3*).

2.2.25 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

Elektrokompente Bakterien wurden von DH5α und den Expressionsstämmen SG13009 und M15 hergestellt. Dazu wurden jeweils 80 ml LB-Medium (im Falle der Expressionstämme

mit 25 µg/ml Kanamycin) mit 1,5 ml einer üN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 37°C mit 185 Upm geschüttelt. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Bakterien wurden für 10 min bei 2800 x g sedimentiert, mit 40 ml Millipore-Wasser gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Waschschrift wurden zweimal wiederholt und die Bakterien wurden abschliessend in 200 µl Millipore-Wasser resuspendiert. Nach der Bestimmung des Volumens wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben und die Bakterien in 40 µl Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.26 Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen

Für die Transformation von Plasmiden wurden Hitzeschock-kompetente (JM109) oder elektrokompente Bakterienzellen (DH5α, SG13009, M15) eingesetzt. Die Transformation mittels Hitzeschock erfolge durch Inkubation des Transformationsansatzes bei 42°C (45 s).

Bei der Elektroporation wurden die zu transformierenden Plasmide in Wasser gelöst und den elektrokompenten Bakterienzellen zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde in eine gekühlte (4°C) Transformationsküvette gefüllt, deren Elektrodenabstand 0,2 mm betrug. Die Elektroporation wurde durch einen kurzen Stromimpuls (Spannung: 2,5 kV, Widerstand: 200 Ω, Kapazität: 25 µF) erreicht. Nach Zugabe von 500 µl 42°C warmen SOC-Medium wurden die Bakterien für mindestens 45 min bei 37°C geschüttelt und anschließend auf Agarplatten ausplattiert.

2.2.27 Synthese von rekombinanten Proteinen in Bakterienzellen

Zur Produktion von rekombinanten Proteinen wurde das „QIAexpress-System Typ IV“ verwendet. Folgende Bakterienstämme wurden verwendet: SG13009 für *Gm4CL1* und *Gm4CL4*, M15 für *Gm4CL2* und *Gm4CL3*. Für die Synthese der rekombinanten Proteine wurden 80 ml $LB_{amp/kan}$ -Medium mit 1,5 ml einer üN-Kultur der transformierten Bakterien angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 37°C und 185 Upm geschüttelt. Nach Erreichen dieser optischen Dichte wurde die Expression der *Gm4CL*-cDNAs mit 1mM IPTG induziert und die Bakterien für weitere 3 h zur Synthese der rekombinanten Protein inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 4400 x g bei 4°C abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

Zur Ermittlung der optimalen Induktionsdauer wurde eine Expressionskinetik mit der *Gm4CL1* und *Gm4CL3* durchgeführt. Dazu wurden einer Expressionskultur zu verschiedenen Induktionszeiten (0 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h) jeweils die einer optischen Dichte von eins entsprechende Menge an Bakterien entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (18000 x

g, 1 min), der Überstand gründlich abgenommen und die Bakterien in 50 μ l Proteinprobenpuffer resuspendiert. Die Ansätze wurden 5 min bei 95°C inkubiert, zentrifugiert (18000 x g, 1 min) und jeweils 5 μ l vom Überstand wurden auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.2.28 Isolierung von Proteinen aus Bakterienzellen

Gefrorene Bakterienzellen wurden in 6 ml Aufarbeitungspuffer resuspendiert und mittels eines Branson Sonifier 450 im Rosettgefäß (3-15 ml) bei 4°C für 10 min lysiert. Bei einer Einzelimpulsdauer von 400 ms pro Sekunde wurde die Ultraschall-Intensitätsstufe 4 gewählt, so daß die resultierende Leistung jedes Impulses 400 Watt betrug. Zellfragmente wurden anschließend durch Zentrifugation (18000 x g, 20 min, 4°C) abgetrennt und die Proteinextrakte in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.29 Metallchelat-Affinitätschromatographie

Die Anreicherung rekombinanter Proteine, die eine N-terminale Poly-Histidin-Sequenz besaßen, wurde mit einer Ni-NTA-Matrix (Nickel-Nitrilotriessigsäure) im Säulenchromatographie-Verfahren bei 4°C durchgeführt. Dazu wurde 1 ml Ni-NTA-Matrix (Bindungskapazität von 5-10 mg Protein) mit dem 5-fachen Säulenvolumen Äquilibrationpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Proteinextrakt auf die Säule aufgetragen und mit 10 ml Äquilibrationpuffer gewaschen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 1 ml Waschpuffer entfernt. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer, wobei 0,5 ml Fraktionen gesammelt wurden.

2.2.30 Strukturanalysen

2.2.30.1 Struktur-Vorhersage

Die Vorhersage von Proteinstrukturen wurde mit Hilfe des Online-Dienstes von SWISS-MODEL (Peitsch, 1996) nach Anweisungen des Anbieters durchgeführt. Die dreidimensionalen Strukturen der *Gm4CL1*, *Gm4CL1iV344*, *Gm4CL3* und *Gm4CLdV367* wurden mit Hilfe der bereits bekannten Kristallstruktur der Luciferase aus *Photinus pyralis* modelliert (PDB Code: 1LCI und 1BA3). Die Bearbeitung der Strukturmodelle erfolgte mit dem Programm Swiss-PdbViewer v3.6b3 (Guex und Peitsch,1997). Für Strukturvergleiche

wurde die dreidimensionale Struktur der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramicidin-S-Synthetase aus der Protein-Datenbank (PDB Code: 1AMU) bezogen.

2.2.30.2 Hybrid-Bildung

Die Herstellung von *Gm4CL1/Gm4CL3*-cDNA-Hybriden erfolgte durch die Nutzung gleichgelegener Restriktionsschnittstellen (*Ecl136II*, *EcoRV*; Abb. 6) oder durch Verwendung mittels PCR eingeführter Schnittstellen (*AgeI* bei *Gm4CL1*, *SplI* und *XmaIII* bei *Gm4CL3*; Abb. 6). Für die PCR mit *Pfu* DNA-Polymerase das PCR-Programm P8 (Anhang A1) eingesetzt. Zur Hybridbildung wurden die Expressionsvektoren pQE-30/*Gm4CL1* und pQE-31/*Gm4CL3* herangezogen. Die Synthese der Hybridproteine wurde wie in Kapitel 2.2.27 beschrieben durchgeführt.

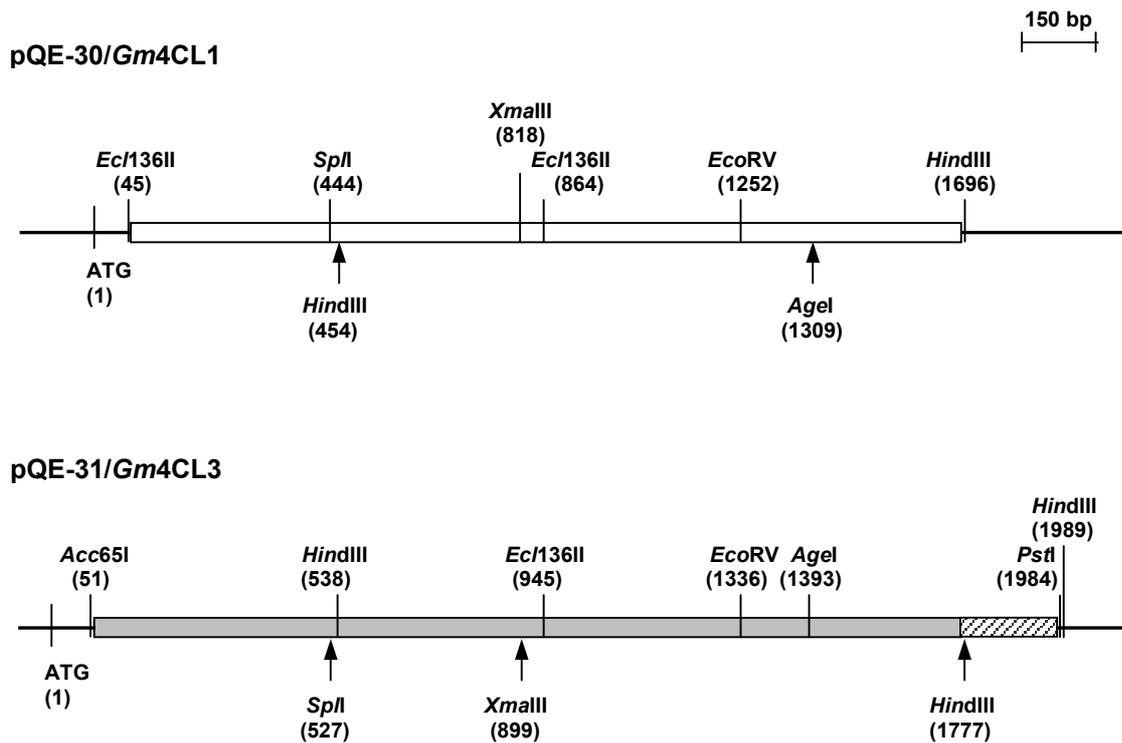


Abb. 6: Schematische Darstellung der *Gm4CL1*- und *Gm4CL3*-cDNA in den jeweiligen Expressionsvektoren. Die zur Hybridherstellung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Die Positionen der Schnittstellen beziehen sich auf das Startcodon des Expressionsvektors. Die Pfeile markieren die Lage der mittels PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen. Der schraffierte Abschnitt in pQE-31/*Gm4CL3* markiert den nicht-translatierten 3'-Bereich der *Gm4CL3*-cDNA.

—: Teilsequenz des Expressionsvektors

pQE-30/H1

Das *EcoRV/HindIII*-Fragment von pQE-30/*Gm4CL1* wurde durch das entsprechende *EcoRV/HindIII*-Fragment von pQE-31/*Gm4CL3* ersetzt.

Resultierendes Hybridprotein H1: *Gm4CL1*_{M1-G400}::*Gm4CL3*_{Y425-P570}

pQE-30/H2

Aus dem Vektor pQE-30/*Gm4CL1* wurde mit *XmaIII* und *HindIII* ein 3'-Fragment der *Gm4CL1*-cDNA (878 bp) ausgeschnitten (pQE-30/*Gm4CL1*_{Δ819-1696}). Das diesem Fragment entsprechende 3'-Fragment der *Gm4CL3*-cDNA wurde mittels PCR mit den Primern 4CL3-*XmaIII*-For und 4CL3-*HindIII*-Rev amplifiziert. Nach Restriktion des amplifizierten Fragmentes mit *XmaIII* und *HindIII* erfolgte die Ligation in pQE-30/*Gm4CL1*_{Δ819-1696}.

Resultierendes Hybridprotein H2: *Gm4CL1*_{M1-A256}::*Gm4CL3*_{A280-P570}

pQE-30/H3

Aus dem Vektor pQE-30/*Gm4CL1* wurde mit *SplI* und *HindIII* ein 3'-Fragment der *Gm4CL1*-cDNA (1252 bp) ausgeschnitten (pQE-30/*Gm4CL1*_{Δ445-1696}). Das diesem Fragment entsprechende 3'-Fragment der *Gm4CL3*-cDNA wurde mittels PCR mit den Primern 4CL3-*SplI*-For und 4CL3-*HindIII*-Rev amplifiziert. Nach Restriktion des amplifizierten Fragmentes mit *SplI* und *HindIII* erfolgte die Ligation in pQE-30/*Gm4CL1*_{Δ445-1696}.

Resultierendes Hybridprotein H3: *Gm4CL1*_{M1-A131}::*Gm4CL3*_{Y156-P570}

pQE-30/H4

Mittels PCR mit 4CL3-*SplI*-For und 4CL1-*HindIII*-Rev als Primer und pQE-31/*H5* als DNA-Matrize wurde ein 3'-Fragment von *H5* amplifiziert. Nach anschließender *SplI/HindIII*-Restriktion des amplifizierten 3'-Fragmentes erfolgte die Ligation in den Vektor pQE-30/*Gm4CL1*_{Δ445-1696} (siehe pQE-30/H3).

Resultierendes Hybridprotein H4: *Gm4CL1*_{M1-A131}::*Gm4CL3*_{Y156-T444}::*Gm4CL1*_{G421-N546}

pQE-31/H5

Der Vektor pQE-31/*Gm4CL3* wurde mit *PstI* geschnitten und mit S1-Nuklease zur Herstellung von glatten Enden behandelt. Durch Restriktion mit *AgeI* wurde ein 380 bp langes 3'-Fragment des codierenden Bereiches der *Gm4CL3*-cDNA ausgeschnitten (pQE-31/*Gm4CL3*_{Δ1394-1984}). Das dem 3'-Fragment der *Gm4CL3* entsprechende Fragment der *Gm4CL1*-cDNA wurde mittels PCR mit 4CL1-*AgeI* und 4CL1-*HindIII*-Rev als Primer amplifiziert. Nach Restriktion des *Gm4CL1*-Fragmentes mit *AgeI* erfolgte dessen Ligation in den Vektor pQE-31/*Gm4CL3*_{Δ1394-1984}.

Resultierendes Hybridprotein H5: *Gm4CL3*_{M1-T444}::*Gm4CL1*_{G421-N546}

pQE-30/H6

Nachdem aus dem Vektor pQE-30/*Gm4CL1* mit *Ecl136II* ein 813 bp langes 5'-Fragment der *Gm4CL1*-cDNA ausgeschnitten wurde, erfolgte die Behandlung des Vektors mit alkalischer Phosphatase zur Entfernung der endständigen 5'-Phosphatgruppen (pQE-30/*Gm4CL1*_{Δ46-864}). Aus dem Vektor pQE-31/*Gm4CL3* wurde mit *Acc65I* und *Ecl136II* ein dem 5'-Fragment der *4CL1*-cDNA entsprechendes Fragment ausgeschnitten (889 bp) und zur Bildung glatter Enden mit Klenow-Enzym behandelt. Anschließend erfolgte die Ligation des 5'-Fragmentes der *Gm4CL3* in den Vektor pQE-30/*Gm4CL1*_{Δ46-864}.

Resultierendes Hybridprotein H6: *Gm4CL3*_{M1-E294}::*Gm4CL1*_{L272-N546}

pQE-31/H7

Aus dem Vektor pQE-31/*Gm4CL3* wurde mit *HindIII* ein 1239 bp langes 3'-Fragment des codierenden Bereiches der *Gm4CL3*-cDNA ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Behandlung des Vektors mit alkalischer Phosphatase zur Entfernung endständiger 5'-Phosphatgruppen (pQE-31/*Gm4CL3*_{Δ539-1989}). Das dem 3'-Ende der *Gm4CL3*-cDNA entsprechende Fragment der *Gm4CL1*-cDNA wurde mittels PCR mit *4CL1-HindIII-For* und *4CL1-HindIII-Rev* als Primer amplifiziert. Nach Restriktion des *Gm4CL1*-Fragmentes erfolgte die Ligation in den Vektor pQE-31/*Gm4CL3*_{Δ539-1989}.

Resultierendes Hybridprotein H7: *Gm4CL3*_{M1-K159}::*Gm4CL1*_{I136-N546}

pQE-31/H8

Mittels PCR mit *4CL1-HindIII-For* und *4CL3-HindIII-Rev* als Primer wurde ein 3'-Fragment von pQE-30/*H1* amplifiziert. Nach *HindIII*-Restriktion des amplifizierten 3'-Fragmentes erfolgte die Ligation in den Vektor pQE-31/*Gm4CL3*_{Δ539-1989}.

Resultierendes Hybridprotein H8: *Gm4CL3*_{M1-K159}::*Gm4CL1*_{I136-G400}::*Gm4CL3*_{Y425-P570}

pQE-30/H9

Das *EcoRV/HindIII*-Fragment aus dem Vektor pQE-30/*H6* wurde durch das entsprechende *EcoRV/HindIII*-Fragment aus pQE-31/*Gm4CL3* ersetzt.

Resultierendes Hybridprotein H9: *Gm4CL3*_{M1-E294}::*Gm4CL1*_{L272-G400}::*Gm4CL3*_{Y425-P570}

2.2.30.3 *In-vitro*-Mutagenese mit PCR

Die *in-vitro*-Mutagenese von DNA-Sequenzen wurde in Anlehnung an Papworth et al. (1996) und Nelson et al. (1992) durchgeführt (Abb. 7). Zur Einführung der Mutationen wurden jeweils 10 ng Plasmid (pQE-30/*Gm4CL1*, pQE-30/*Gm4CL2*, pQE-30/*Gm4CL2dV345*, pQE-31/*Gm4CL3*), 1 μM je Oligonukleotid-Primer, 0,2 mM dNTPs und 1 U *Pfu* DNA-Polymerase pro 15 μl Ansatz eingesetzt. Für den Austausch von 1-2 bp wurde für die PCR-Primer eine

Schmelztemperatur von 65-70°C, für die Deletion bzw. Insertion von Basenpaaren wurde eine Schmelztemperatur von 75-77°C gewählt. Die Schmelztemperatur wurde mit nachstehender Formel abgeschätzt:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \text{GC} (\%) - 675/\text{Anzahl der Primerbasen} - \text{Sequenzabweichung} (\%)$$

Die Amplifizierung der Plasmide und die damit verbundene Einführung der Mutationen erfolgte unter den Bedingungen des PCR-Programms P9 (Anhang A1). Von den Ansätzen wurden jeweils 5 µl zur Überprüfung der Amplifikation in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, während die verbliebenen 10 µl mit jeweils 4 U *DpnI* behandelt wurden (90 min, 37°C). Anschließend wurden die Plasmide mit Ethanol gefällt, in 10 µl Wasser aufgenommen und davon 1 µl in *E. coli* DH5α transformiert. Die Plasmide wurden aus *E. coli* DH5α (2 ml üN-Kulturen) isoliert, in 12 µl Wasser gelöst und die Mutationen mittels Sequenzierung überprüft. Mutierte Plasmide wurden in den *E. coli*-Expressionsstamm SG13009 transformiert. Die Synthese der *Gm4CL*-Mutanten erfolgte wie im Kapitel 2.2.27 beschrieben.

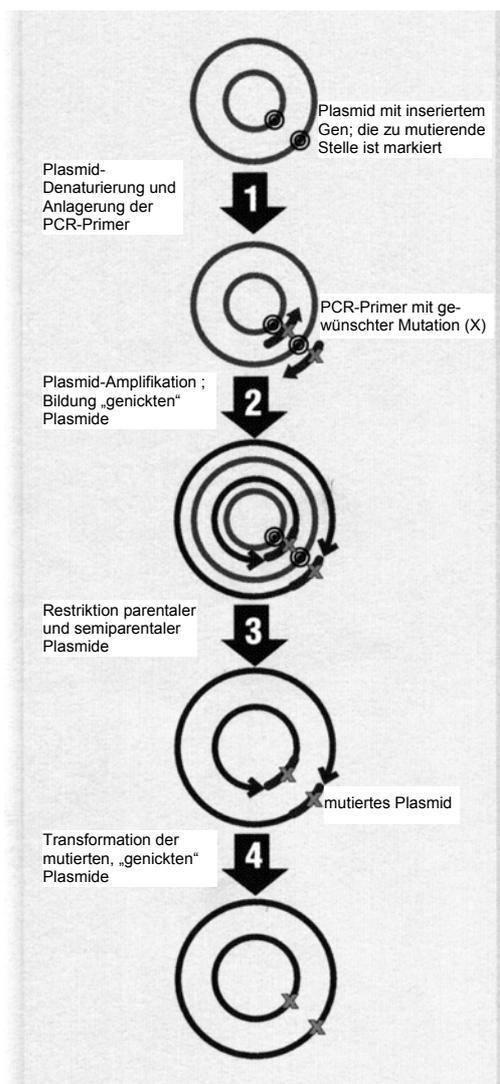


Abb. 7: Vorgehensweise bei der *in-vitro*-Mutagenese.

1. Plasmid-Denaturierung und Anlagerung der PCR-Primer mit der gewünschten Mutation.
2. Amplifikation des Plasmids und Einführung der Mutation. Entstehung von „genickten“ Plasmiden.
3. *DpnI*-Restriktion der parentalen und semi-parentalen Plasmide.
4. Transformation der „genickten“ Plasmide in *E. coli* DH5α. Dieser Bakterienstamm ist in der Lage, die „genickten“ Plasmide zu reparieren.
(Abbildung aus Stratogene-Katalog 2000)

3 Ergebnisse

3.1 Molekulare und physiologische Charakterisierung der *Gm4CL*-Isoformen

3.1.2 Das experimentelle System zur Isolierung der *Gm4CL1*-cDNA

Die Aktivität der *Gm4CL1* wurde bisher nur in Sojabohnenzellkulturen und nicht in Sojabohnepflanzen untersucht (Ebel et al., 1974; Knobloch und Hahlbrock, 1975; Hille et al., 1982). In nicht-induzierten Zellkulturen konnte vor allem in den Wachstumsstadien I und II erhöhte *Gm4CL1*-Aktivität gemessen werden (Hille et al., 1982). Da *Gm4CL1* aus Sojabohnesuspensionkulturen des Stadiums II angereichert werden konnte (Knobloch und Hahlbrock, 1975; C. Lindermayr, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse der Diplomarbeit, LMU München), wurde zur Isolierung der *Gm4CL1*-cDNA dieses Wachstumsstadium ausgewählt.

3.1.3 Klonierung eines *Gm4CL1*-Fragments

Von den Aminosäuresequenzen der Peptide *Gm4CL1*-N-Terminus, *Gm4CL1*-S1 und *Gm4CL1*-S2, die durch Mikrosequenzierung der gereinigten *Gm4CL1* erhalten wurden (C. Lindermayr, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse der Diplomarbeit, LMU München), wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer abgeleitet, die zur Amplifikation eines *Gm4CL1*-Fragments mittels RT-PCR eingesetzt wurden. Um den cDNA-Abschnitt zwischen den kodierenden Bereichen der Peptide *Gm4CL1*-S1 und *Gm4CL1*-S2 amplifizieren zu können, wurde die Oligonukleotidsequenz von *Gm4CL1*-S2 vom kodierenden DNA-Strang und die Oligonukleotidsequenz von *Gm4CL1*-S1 vom Komplementärstrang abgeleitet. Bei allen bisher bekannten 4CLs waren die zu den Peptiden *Gm4CL1*-S1 und *Gm4CL1*-S2 homologen Bereiche in einem Abstand von ca. 280AS lokalisiert, so daß ein RT-PCR-Produkt von ca. 800 bp erwartet wurde. Das degenerierte Oligonukleotid des N-terminalen *Gm4CL1*-Peptids (4CL1-S3) wurde zusammen mit dem 4CL1-S1-Oligonukleotid in die RT-PCR eingesetzt. Mit dieser Primerkombination wurde ein Fragment von ca. 1250 bp erwartet.

Für die RT-PCR wurde Gesamt-RNA aus nicht-induzierten Sojabohnenzellkulturen des Stadiums II (Hille et al., 1982) als Matrize eingesetzt. Mit den degenerierten Oligonukleotiden 4CL1-S1 und 4CL1-S3 konnte kein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert werden, während die Primerkombination 4CL1-S1 und 4CL1-S2 ein Produkt von 837 bp lieferte. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des amplifizierten Fragments zeigte gegenüber den homologen Bereichen der *Gm4CL2*, *Gm4CL3* und *Gm4CL16* eine Identität von 58-59%. Zudem konnten die hochkonservierten Boxen I (SSGTTGLPKG) und II

(GEICIRG) (Becker-André et al., 1991) identifiziert werden, wenngleich an Position 5 der Box I an Stelle des Threonins ein Serin vorhanden war. Die Sequenzdaten deuteten darauf hin, daß es sich bei dem RT-PCR-Produkt mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Fragment einer bisher noch nicht beschriebenen 4CL-Sequenz aus Sojabohne – vermutlich um eine Teilsequenz der *Gm4CL1* – handelte. Daher wurde das amplifizierte Fragment *Gm4CL1-S1/S2* als Sonde zum Durchmustern einer cDNA-Bank eingesetzt.

3.1.4 Isolierung der *Gm4CL1*-cDNA

Mit Poly(A)⁺-RNA aus nicht-induzierten Sojabohnezellkulturen des Stadiums II als Matrize wurde cDNA synthetisiert und nach Ligation mit Adaptersequenzen in die Arme des Ziplox-Phagen ligiert. Die erhaltene λ -DNA wurde durch *in-vitro*-Verpackung in λ -Partikel eingeführt, die zur Infektion von *Escherichia coli* benutzt wurden. Die synthetisierte cDNA-Bank enthielt $5,0 \times 10^4$ rekombinante Phagen. Durch Plaquehybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde *Gm4CL1-S1/S2* konnte aus der gesamten cDNA-Bank ein Klon identifiziert werden, der mit der *Gm4CL1*-Sonde hybridisierte. Durch *in-vivo*-Excision wurde die inserierte cDNA aus den Phagen isoliert. Die cDNA-Sequenz hatte eine Gesamtlänge von 1736 bp und setzte sich aus einem offenen Leserahmen von 1584 bp (entspricht 528 AS), 130 bp 3'-NTR und einem Poly(A)-Schwanz zusammen. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz der isolierten cDNA konnte die Sequenz des Peptids *Gm4CL-S1* identifiziert werden. Der zur Aminosäureabfolge des Peptids *Gm4CL1-S2* homologe Bereich besaß an Position 2 ein Threonin statt eines Alanins und an Position 6 ein Isoleucin an Stelle eines Leucins (Positionsangaben beziehen sich auf das Peptid *Gm4CL1-S2*). Die Region zwischen den Peptiden *Gm4CL1-S1* und *Gm4CL1-S2* war vollkommen sequenzidentisch mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der eingesetzten Sonde. Die Identifizierung der Sequenz der Peptide *Gm4CL1-S1* und *Gm4CL1-S2* war, trotz der beiden Sequenzunterschiede, ein Indiz dafür, daß hier die cDNA der *Gm4CL1* isoliert wurde. Allerdings zeigte der Vergleich mit bereits bekannten 4CL-Sequenzen, daß die Sequenz nicht vollständig war. Dafür sprach auch, daß die Sequenz des N-terminalen Peptids nicht gefunden werden konnte. Da die bisher bekannten 4CLs eine Länge von 540 bis 600 AS besaßen und die Unterschiede meist durch die Länge der N-Termini bestimmt wurden, konnte abgeschätzt werden, daß dem isolierten *Gm4CL1*-Klon ca. 50 bis 200 kodierende Basenpaare am 5'-Ende fehlten.

3.1.5 Vervollständigung der *Gm4CL1*-cDNA

Der fehlende 5'-Bereich der *Gm4CL1*-cDNA wurde mittels 5'-RACE vervollständigt. Das amplifizierte Fragment enthielt 35 bp der 5'-NTR und 54 bisher nicht bekannte Basenpaare

des kodierenden 5'-Endes der *Gm4CL1*. Zudem besaß es eine Überlappung mit dem bereits isolierten *Gm4CL1*-Fragment (Anhang A2) von 164 bp. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz des 5'-RACE-Produkts wurde die Sequenz des N-terminalen Peptids identifiziert, wodurch das Startcodon ermittelt werden konnte. Die Sequenz des N-terminalen Peptids der gereinigten *Gm4CL1* stimmte bis auf das Glycin an Position 2 und dem Leucin an Position 10 mit dem N-Terminus der abgeleiteten Aminosäuresequenz des 5'-RACE-Fragments überein. Die Gesamtlänge der *Gm4CL1*-cDNA betrug somit 1825 bp mit einem offenen Leserahmen von 1641 bp, der für ein Protein mit 546 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 59,4 kDa kodierte (Anhang A2).

3.1.6 Vervollständigung der *Gm4CL4*-cDNA

Das von Uhlmann und Ebel (1993) isolierte *Gm4CL4*-Fragment (*Gm4CL16*) hatte eine Länge von 1491 bp und kodierte für 423 Aminosäuren. Da die *Gm4CL16* sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene eine Identität von über 95% gegenüber *Gm4CL3* aufwies, wurde angenommen, daß die komplette *Gm4CL16* annähernd die gleiche Größe besitzt wie die *Gm4CL3* (etwa 570 Aminosäuren). Folglich fehlten ca. 450 kodierende Basenpaare am 5'-Ende der *Gm4CL16*-Sequenz. Die Vervollständigung der *Gm4CL4*-cDNA wurde ebenfalls durch 5'-RACE durchgeführt. Als Matrize wurde Gesamt-RNA aus 4 h mit β -Glucan-Elicitor behandelten Sojabohnenzellkulturen verwendet, da die partielle *Gm4CL4*-cDNA aus induzierten Zellen isoliert wurde (Uhlmann und Ebel, 1993). Damit die verwendeten Oligonukleotide möglichst selektiv an *Gm4CL16* anlagerten, wurden sie aus Bereichen der *Gm4CL16* abgeleitet, die möglichst große Unterschiede zur *Gm4CL3* aufwiesen.

Es konnte ein 792 bp langes Fragment amplifiziert werden, das sich aus 342 bp der bereits bekannten *Gm4CL16*, aus 33 nicht-kodierenden und 417 kodierenden bp des fehlenden 5'-Ende der *Gm4CL4* zusammensetzte (Anhang A3). Die gesamte *Gm4CL4*-cDNA hatte eine Länge von 1941 bp mit einem offenen Leserahmen von 1689 bp (Anhang A3). Dieser kodierte für ein Protein mit 562 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 61 kDa.

3.1.7 Sequenzvergleiche der 4CL-Isoformen aus Sojabohne und anderen Pflanzen

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *Gm4CLs* ist in Abbildung 8 gezeigt. Die Aminosäuresequenzen der *Gm4CL3* und *Gm4CL4* sind um ca. 20 AS länger als die der *Gm4CL1* und *Gm4CL2*. Die unterschiedlichen Größen sind vor allem auf die verschieden langen N-Termini zurückzuführen. Der Sequenzvergleich der 4CL-Isoformen aus Sojabohne zeigte, daß *Gm4CL1* und *Gm4CL2* sowohl untereinander als auch gegenüber *Gm4CL3* bzw.

Tab. 5: Charakteristika und Sequenzvergleiche der 4CL-Isoformen aus Sojabohne.

	<i>Gm4CL1</i>	<i>Gm4CL2</i>	<i>Gm4CL3</i>	<i>Gm4CL4</i>
cDNA-Länge	1825 bp	1869 bp	1907 bp	1941 bp
ORF	1641 bp	1644 bp	1713 bp	1689 bp
Aminosäuren	546	547	570	562
Molekulargewicht	59.4 kDa	60.2 kDa	61.8 kDa	61.0 kDa
Vergleich der Aminosäure- und Nukleotidsequenzen				
<i>Gm4CL1</i>	-	63/65	57/60	58/61
<i>Gm4CL2</i>	-	-	61/61	60/62
<i>Gm4CL3</i>	-	-	-	94/93

Aufgeführt ist ein Vergleich der Aminosäure- und Nukleotidsequenzen der Sojabohne-4CL-Isoformen. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Computerprogramm BioEdit (Hall, 1999) durchgeführt. Die Identitäten zweier Sequenzen zueinander sind in Prozent-Werten angegeben. Die Werte in Standardschrift bezeichnen die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen. Kursiv sind die Identitäten der Nukleotidsequenzen angegeben.

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen einiger bisher klonierten pflanzlichen 4CLs zeigte, daß die 4CL-Proteine vor allem im zentralen und C-terminalen Bereich hoch konserviert sind, während der N-terminale Bereich stärker variiert (Anhang A4). Die von Becker-André et al. (1991) beschriebenen Aminosäuremotive SSGTTGLPKG (Box I) und GEICIRG (Box II) waren bei allen Sojabohne-4CLs in annähernd gleichem Abstand vorhanden.

3.1.8 Phylogenetische Analyse der pflanzlichen 4CL

Ein phylogenetischer Vergleich von 4CL-Aminosäuresequenzen sollte Aufschluß über die Verwandtschaftsverhältnisse der 4CLs geben. Die Analyse wurden mit allen in den Datenbanken verfügbaren 4CL-Aminosäuresequenzen und den in dieser Arbeit klonierten Sojabohne-4CL-Sequenzen durchgeführt. Aus Angiospermen wurden bisher 29 4CL-Sequenzen isoliert, während aus Gymnospermen nur 2 4CL-Sequenzen verfügbar waren. Letztere wurden als *outgroup* verwendet. Die phylogenetische Rekonstruktion zeigte, daß sich innerhalb der Angiospermen zwei 4CL-Gruppen, Klasse I und Klasse II, entwickelt haben (Abb. 9). *Gm4CL1* und *Gm4CL2* wurden der Klasse I zugeordnet, während *Gm4CL3* und *Gm4CL4* in die Klasse II eingeteilt wurden. Von *Arabidopsis thaliana*, Espe (*Populus tremuloides*), Himbeere (*Rubus idaeus*) und Steinsame (*Lithospermum erythrorhiza*) waren ebenfalls Isoformen in beiden Klassen vertreten. Alle bisher bekannten 4CL-Aminosäuresequenzen der Poaceen (Lolch (*Lolium perenne*), Reis (*Oryza sativa*)) wurden der

Klasse II zugeordnet, während die Isoformen aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Tabak (*Nicotiana tabacum*), Petersilie (*Petroselinum crispum*), Vanille (*Vanilla planifolia*) und Hybridpappel (*Populus hybrida*) ausschließlich in Klasse I zu finden waren.

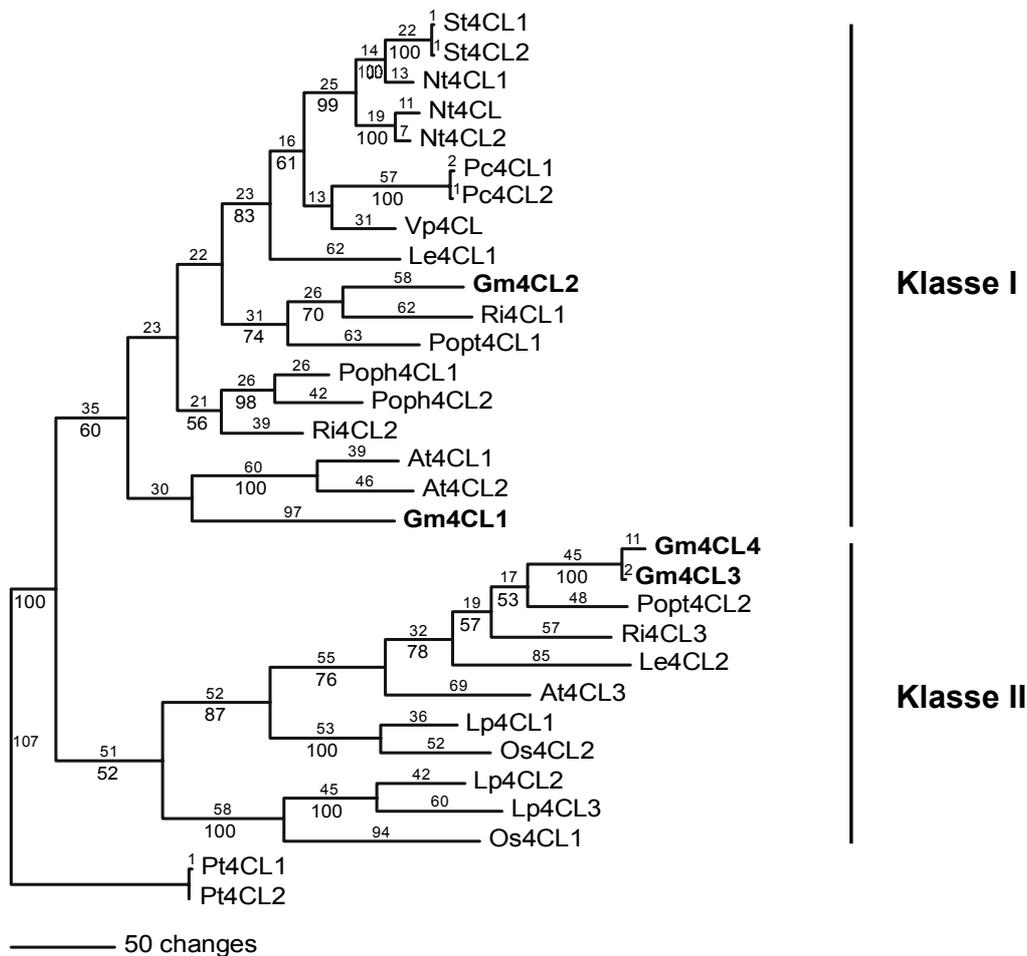


Abb. 9: Phylogenetische Analyse von 31 4CL-Aminosäuresequenzen.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen wurde mit CLUSTAL W 2.0 (Thompson et al., 1994) durchgeführt und per Hand korrigiert. Die phylogenetische Analyse des Sequenzvergleichs erfolgte mit PAUP 4.0 (Swofford, 1998) und ergab einen „most parsimonious“-Evolutionbaum mit einer minimalen Länge von 2155 Schritten und einem Konsistenz-Index von 0,599. Die Astlängen (Anzahl der Aminosäureaustausche) sind oberhalb der entsprechenden Äste angegeben. „Bootstrap“-Werte (Wahrscheinlichkeit der phylogenetischen Aufspaltung) wurden durch 1000 Wiederholungen bestimmt und sind unterhalb der Äste angegeben. Die Pinie-4CLs (*Pt4CL1*, *Pt4CL2*) wurden als *outgroup* verwendet. Die phylogenetische Analyse wurde mit freundlicher Unterstützung von H. Meimberg (Botanisches Institut der LMU, München) durchgeführt.

3.1.9 Verwandte Gene der Sojabohne 4CL-Isoformen in anderen Leguminosen

Aufgrund des Vorhandenseins verschiedener 4CL-Isoformen in Sojabohne wurde die Existenz strukturverwandter 4CL-Isoformen in anderen Leguminosen mittels Northern-Blot-Hybridisierung untersucht. Für die Analysen wurde ein Northern-Blot mit Poly(A)⁺-RNA aus

Keimwurzeln von Sojabohne, Erbse (*Pisum sativum*), Bohne (*Phaseolus vulgaris*), Luzerne (*Medicago sativa*), Lupine (*Lupinus multilupa*) und Saubohne (*Vicia faba*) verwendet (Abb. 10).

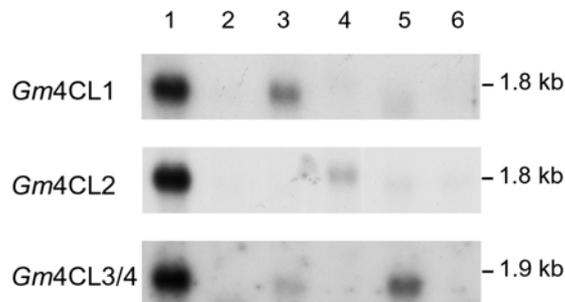


Abb. 10: Vorkommen verschiedener 4CL-Isoformen innerhalb der Leguminosen.

Poly(A)⁺-RNA wurde aus verschiedenen Vertretern der Leguminosen isoliert, je 2,8 µg pro Spur aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die Poly(A)⁺-RNA auf eine Nylomembran übertragen und nacheinander mit den genspezifischen 4CL-Sonden aus Sojabohne hybridisiert. Die Membran wurde unter mäßig stringenten Bedingungen gewaschen (1 x SSC, 0,1% SDS; 20 min, 42°C) und auf einem Röntgenfilm exponiert. RNA folgender Leguminosen wurde aufgetragen: Sojabohne (*G. max*) (1), Erbse (*P. sativum*) (2), Bohne (*P. vulgaris*) (3), Luzerne (*M. sativa*) (4), Lupine (*L. multilupa*) (5) und Saubohne (*V. faba*) (6). Die Größe der hybridisierenden RNAs ist rechts angegeben. Der Poly(A)⁺-Blot wurde freundlicherweise von Dr. Judith Fliegmann (Botanisches Institut der LMU, München) zur Verfügung gestellt.

Zur Transkript-Analyse der verschiedenen Leguminosen-Spezies wurden genspezifische Sonden für *Gm4CL1* und *Gm4CL2* eingesetzt. Mit der verwendeten *Gm4CL3*-Sonde wurden sowohl *Gm4CL3*- als auch *Gm4CL4*-Transkripte detektiert. In Sojabohnekeimwurzeln waren Vertreter von allen vier mRNAs-Spezies vorhanden. In mindestens einer der getesteten Leguminosen-Spezies hybridisierten Transkripte mit einer der eingesetzten Sonden. Die *Gm4CL1*-Sonde hybridisierte bei Bohne, die *Gm4CL2*-Sonde bei Luzerne und die *Gm4CL3/4*-Sonde bei Lupine und Bohne. In Erbse und Saubohne konnten keine kreuzhybridisierenden mRNAs detektiert werden.

3.1.10 Genomische Organisation der Sojabohne-4CLs

Zur Bestimmung der Anzahl der *Gm4CL*-Gene in Sojabohne wurde genomische DNA aus Sojabohnezellkulturen isoliert, mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III behandelt und mittels Southern-Blot-Hybridisierung untersucht. Die Analysen wurden mit den gesamten ORFs von *Gm4CL1* und *Gm4CL2* durchgeführt und mit einem *Gm4CL3*-cDNA-Fragment, mit dem allerdings nicht zwischen den *Gm4CL3*- und *Gm4CL4*-Genen unterschieden werden konnte, da beide *Gm4CL*-Isoformen eine sehr hohe Sequenzidentität zeigten (Kapitel 3.1.7). Unter mäßig stringenten Hybridisierungsbedingungen zeigte die *Gm4CL1*-Sonde eine schwache Kreuzhybridisierung mit cDNA von *Gm4CL2* und *Gm4CL3*,

während die *Gm4CL2*-Sonde nicht mit der *Gm4CL3*-cDNA hybridisierte (Abb. 11). Um die Kreuzhybridisierungen der *Gm4CL1*-Sonde zu unterdrücken, wurden für die Southern-Analysen hoch stringente Hybridisierungsbedingungen gewählt.

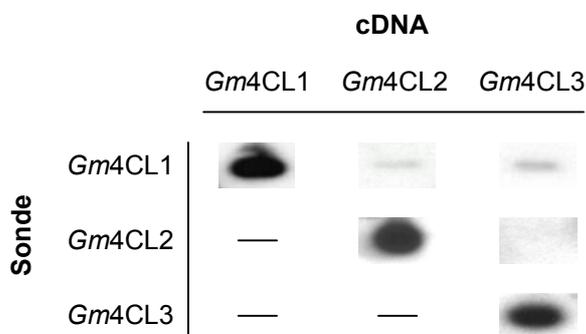


Abb. 11: Kreuzhybridisierungstest mit den verschiedenen *Gm4CL*-Sonden.

Je ca. 10 ng der *Gm4CL1*-, *Gm4CL2*- und *Gm4CL3*-cDNA (*KpnI/HindIII*-Fragment von pQE-30/*Gm4CL1*, *HindIII*-Fragment von pQE-30/*Gm4CL2*, *BamHI/HindIII*-Fragment von pQE-31/*Gm4CL3*) wurden gelelektrophoretische aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membranen wurden in angegebener Weise mit einer *Gm4CL1*-, *Gm4CL2*- und *Gm4CL3*-Sonde (siehe oben angegebene Fragmente) hybridisiert und unter mäßig stringenten Bedingungen gewaschen (0,5 x SSC, 0,1% SDS bei 42°C für 2 x 20 min).

Die eingesetzte *Gm4CL1*-cDNA enthielt keine der verwendeten Restriktionsschnittstellen, während in der *Gm4CL2*-cDNA eine *EcoRI*-Schnittstelle und in der *Gm4CL3*-cDNA eine *HindIII*-Schnittstelle existierte. Mit *BamHI*-geschnittener bzw. *EcoRI*-geschnittener genomischer DNA konnte für *Gm4CL1* jeweils ein Fragment detektiert werden (> 20 kb bzw. 15 kb), während nach *HindIII*-Restriktion drei Fragmente (6,0 kb, 18 kb und 20 kb) nachzuweisen waren (Abb. 12). Jeweils zwei Fragmente hybridisierten nach *BamHI*-Restriktion (10 kb und 20 kb), *EcoRI*-Restriktion (4,6 kb und 7,1 kb) und *HindIII*-Restriktion (3,0 kb und 3,3 kb) der genomischen DNA mit der *Gm4CL2*-Sonde (Abb. 12). Das Restriktionsmuster für *Gm4CL1* nach *BamHI*- bzw. *EcoRI*-Restriktion und für *Gm4CL2* nach *EcoRI*-Restriktion wies auf die Existenz von jeweils nur einem Gen für *Gm4CL1* bzw. *Gm4CL2* hin.

Das Hybridisierungsmuster der *Gm4CL3*-Sonde ließ sich nur unter Berücksichtigung der beiden sehr homologen Isoformen 3 und 4 und mit Hilfe der bekannten *Gm4CL3*-Gensequenz (Möllers, 1997) erklären. Dadurch konnte jeweils ein Fragment nach *BamHI*-Restriktion (7,9 kb) und *EcoRI*-Restriktion (7 kb) und zwei Fragmente nach *HindIII*-Restriktion (2 kb und 3,2 kb) dem *Gm4CL3*-Gen zugewiesen werden (Abb. 12). Die zusätzlich hybridisierenden Fragmente wurden dem *Gm4CL4* Gen zugeteilt. Die Detektion jeweils eines *Gm4CL3*- bzw. *Gm4CL4*-Fragmentes nach Restriktion mit *BamHI* und *EcoRI* bewies die Existenz von jeweils nur einem Gen für *Gm4CL3* bzw. *Gm4CL4*.

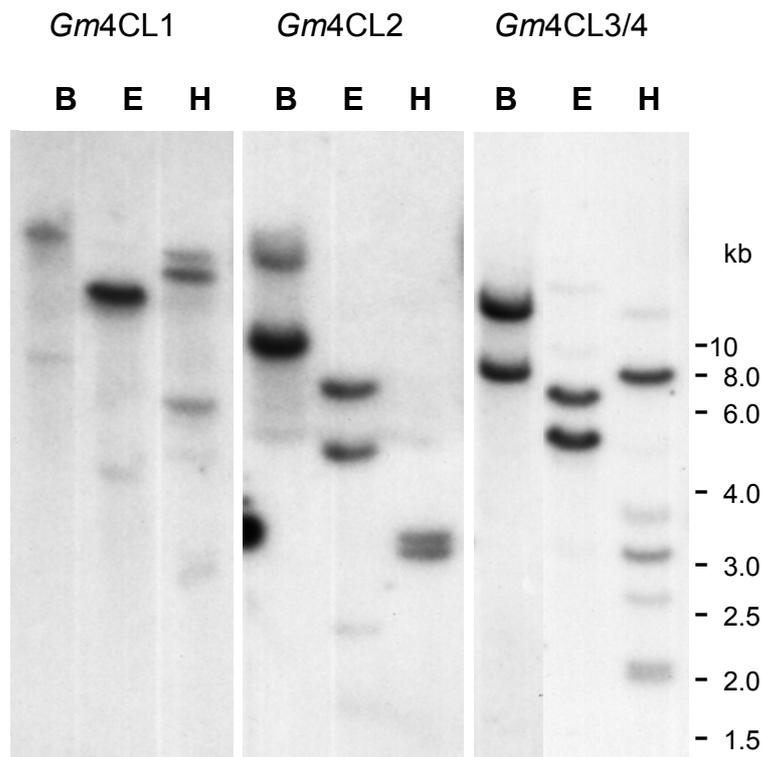


Abb. 12: Southern-Blot-Analyse von genomischer Sojabohne-DNA.

Jeweils 20 µg genomische DNA aus Sojabohnezellkulturen wurden nach Behandlung mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) und *Hind*III (H) in einem 0,6%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Für die Hybridisierung wurde jeweils ein *Kpn*I/*Hind*III-Fragment von pQE-30/*Gm*4CL1, ein *Hind*III-Fragment von pQE-30/*Gm*4CL2 und ein *Bam*HI/*Hind*III-Fragment von pQE-31/*Gm*4CL3 als Sonde unter hoch stringenten Bedingungen (0,1 x SSC, 65°C, 30 min) eingesetzt. DNA-Größenstandards sind rechts angegeben.

3.1.11 Organspezifische Verteilung der *Gm*4CL-Isoformen in Sojabohnekeimlingen

Um Hinweise auf die Funktion der verschiedenen 4CL-Isoformen aus Sojabohne zu bekommen, wurde die organspezifische Expression der *Gm*4CL-Isogene in Sojabohnekeimlingen untersucht. Aus 3 d alten Keimwurzeln, 12 d alten Wurzeln, verholztem Hypokotyl, erstem und zweitem Internodium, Sproßspitzen und jungen und alten Laubblättern von 21 d alten Sojabohnepflanzen wurde Gesamt-RNA isoliert, um Northern-Blot-Analysen durchzuführen (Abb. 13A). Es zeigte sich, daß die Gene der Isoformen 3 und 4 im Wurzel- und Hypokotylbereich exprimiert wurden, während *Gm*4CL1- und *Gm*4CL2-mRNA vornehmlich in den Stengelbereichen und in 3 d Wurzeln nachgewiesen werden konnten. Schwache Expression dieser beiden Isogene trat auch in 12 d alten Wurzeln auf. In Sproßspitzen und Blättern konnte unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine mRNA der vier Isoformen nachgewiesen werden. Durch Western-Blot-Analysen konnte aber gezeigt werden, daß auch hier 4CL vorhanden ist (Abb. 13B).

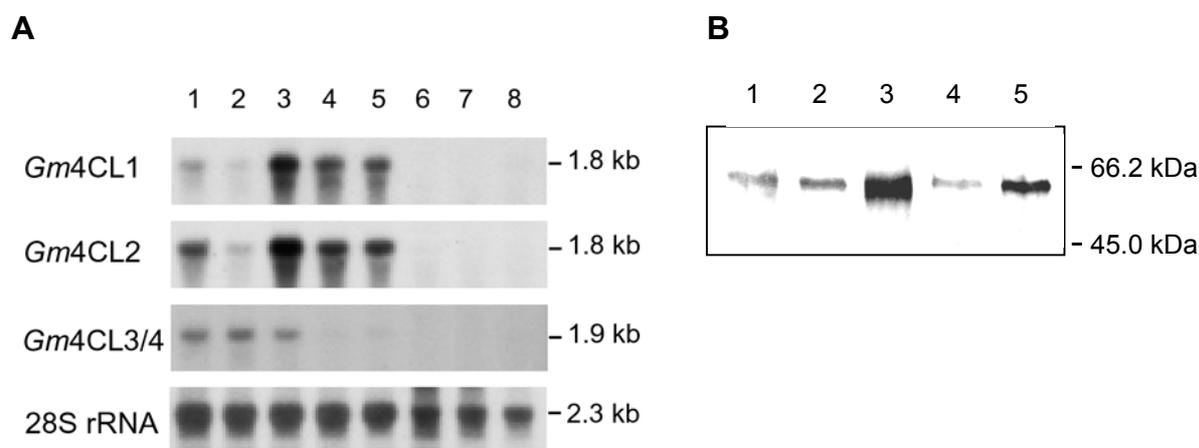


Abb. 13: Organspezifische Verteilung der 4CL in Sojabohnekeimlingen.

A) Organspezifische Expression der 4CL-Gene in Sojabohnekeimlingen.

Jeweils 20 μg Gesamt-RNA aus verschiedenen Pflanzenorganen wurden in einem 1,2%igem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit genspezifischen 4CL-Sonden hybridisiert und unter hoch stringenten Bedingungen (0,1 x SSC, 65°C, 30 min) gewaschen. Die Hybridisierung mit einer für 28S-rRNA-spezifischen Sonde diente als Ladungskontrolle. Die Größe der hybridisierten RNAs ist rechts angegeben. Gesamt-RNA wurde aus drei Tage (1) und 12 Tage (2) alten Sojabohnekeimwurzeln, aus Hypokotyl (3), erstem Internodium (4), zweitem Internodium (5), Sproßspitzen (6), jungen Blättern (7) und alten Blättern (8) von 21 Tage alten Sojabohnekeimlingen isoliert.

B) Immunologischer Nachweis der 4CL in verschiedenen Organen von Sojabohnekeimlingen.

Jeweils 100 μg Proteinrohextrakt verschiedener Organe von Sojabohnekeimlingen wurden in einem 10%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einem gegen Petersilie-4CL gerichteten Antiserum (1:20000) inkubiert. Molekulargewichtsstandards sind rechts angegeben. Proteineextrakte wurden aus drei Tage (1) und 12 Tage (2) alten Sojabohnekeimwurzeln, aus Hypokotyl (3), jungen Blättern (4) und Sproßspitzen (5) von 21 Tage alten Sojabohnekeimlingen hergestellt.

Untersucht wurden Proteinextrakte aus 3 d alten Keimwurzeln, 12 d alten Wurzeln, 21 d altem Hypokotyl, jungen Blättern und Sproßspitzen von Sojabohnekeimlingen. In allen Pflanzenteilen erkannte der gegen Petersilie-4CL gerichtete Antikörper (Ragg et al., 1981) Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Die größte Menge an kreuzreagierendem Protein wurde im Hypokotyl und in Sproßspitzen nachgewiesen, während geringere Menge in den Wurzelbereichen und in Blättern detektiert wurden.

Aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse zwischen den Northern- und Western-Analysen wurden die 4CL-Aktivitäten in den verschiedenen Pflanzenextrakten, die für die Western-Analysen verwendet wurden, mit 4-Cumarsäure, Ferulasäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure ermittelt und die Aktivitäten der einzelnen *Gm4CL*-Isoformen errechnet (Tab. 6). Der höchste Umsatz mit den eingesetzten Zimtsäurederivaten wurden jeweils im Hypokotylextrakt gemessen, gefolgt von Sproßspitzenextrakt und Extrakt aus 12 d alten Wurzeln. In Keimwurzeln und jungen Blättern wurde die geringste *Gm4CL*-Aktivität gemessen. Die Berechnung der Aktivitäten der einzelnen *Gm4CL*-Isoformen ergab, daß in jedem der getesteten Organe die Isoform 1 dominiert, wobei sie vor allem im Hypokotyl (68,1 $\mu\text{kat}/\text{kg}$) und in Sproßspitzen (34,3 $\mu\text{kat}/\text{kg}$) aktiv ist.

Tab. 6: Aktivitäten der 4CL-Isoformen in verschiedenen Organen der Sojabohnepflanze.

	Keimwurzeln 3d	alte Wurzeln 12d	Hypokotyl 21d	junge Blätter 21d	Sproßspitzen 21d
Proteingehalt [mg/ml]	2.9	0.6	1.4	2.9	1.9
gemessene spezifische Aktivität [µkat/kg]					
4-Cumarsäure	13.3	21.6	68.1	9.4	43.2
Ferulasäure	9.9	18.9	77.4	10.5	40.4
3,4-Dimethoxyzimtsäure	8.8	15.8	75.0	8.7	31.2
errechnete Aktivitäten der 4CL-Isoformen gegenüber 4-Cumarsäure [µkat/kg]					
<i>Gm4CL1</i>	9.7	17.9	68.1	9.5	34.3
<i>Gm4CL2</i>	1.3	3.2	0	2.5	12.8
<i>Gm4CL3/4</i>	1.3	0.5	0	0	4.0

In Rohextrakten aus verschiedenen Organen der Sojabohnepflanze wurde die *Gm4CL*-Aktivität mit den Substraten 4-Cumarsäure, Ferulasäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure im spektralphotometrischen Test gemessen. Die Berechnung der Aktivitäten der einzelnen *Gm4CL*-Isoformen bzgl. 4-Cumarsäure erfolgte nach der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen Methode.

Gm4CL2 ist vor allem in Sproßspitzen (12,8 µkat/kg) vertreten und in geringem Maß auch in Keimwurzeln (1,3 µkat/kg), alten Wurzeln (3,2 µkat/kg) und in jungen Blättern (2,5 µkat/kg). In Hypokotylextrakten konnten keine *Gm4CL2*-Aktivität bestimmt werden. *Gm4CL3/4* zeigten in allen Organen nur schwache (1,3 µkat/kg in Keimwurzeln, 0,5 µkat/kg in alte Wurzeln, 4,0 µkat/kg in Sproßspitzen) oder keine (Hypokotyl, junge Blätter) Aktivität. Ferner konnte aus Sproßspitzen mittels RT-PCR mit den degenerierten Oligonukleotiden 4CL1-S1 und 4CL1-S2 als PCR-Primer ein ca. 800 bp großes Fragment amplifiziert werden, das mit der genspezifischen *Gm4CL1*-Sonde kreuzhybridisierte. Dies deutet darauf hin, daß zumindest *Gm4CL1*-mRNA in den Sproßspitzen gebildet wird.

3.1.12 Regulation der 4CL-Isoformen nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen

Sojabohnenzellkulturen der Wachstumsstadien I und II wurden mit β -Glucan-Elicitor aus *Phytophthora sojae* behandelt. Über einen Zeitraum von 12 h wurde zu verschiedenen Zeiten die Aktivität der einzelnen *Gm4CL*-Isoformen bestimmt (Abb. 14). Sowohl im Wachstumsstadium I (Abb. 14A) als auch im Wachstumsstadium II (Abb. 14B) konnte das gleiche Verhalten der *Gm4CL*-Isoformen nach Elicitierung der Sojabohnenzellkulturen beobachtet werden. In den mit Wasser behandelten Kontrollzellen konnte nur *Gm4CL1*- und *Gm4CL2*-Aktivität gemessen werden. *Gm4CL3/4* waren in diesem Stadium nicht aktiv. Nach

Elicitorzugabe zeigten die 4CL-Isoformen in den Sojabohnenzellkulturen unterschiedliches Verhalten. Die Aktivität der *Gm4CL1* reduzierte sich nach 12 h Behandlung der Zellkulturen auf ca. 10% des Kontrollwertes, während diejenige der *Gm4CL2* sich im Verlauf der Behandlung nur geringfügig veränderte. Ungefähr 3 h nach Behandlung konnte ein Auftreten der *Gm4CL3/4*-Aktivität gemessen werden, die nach ca. 10 h ihr Maximum erreichte.

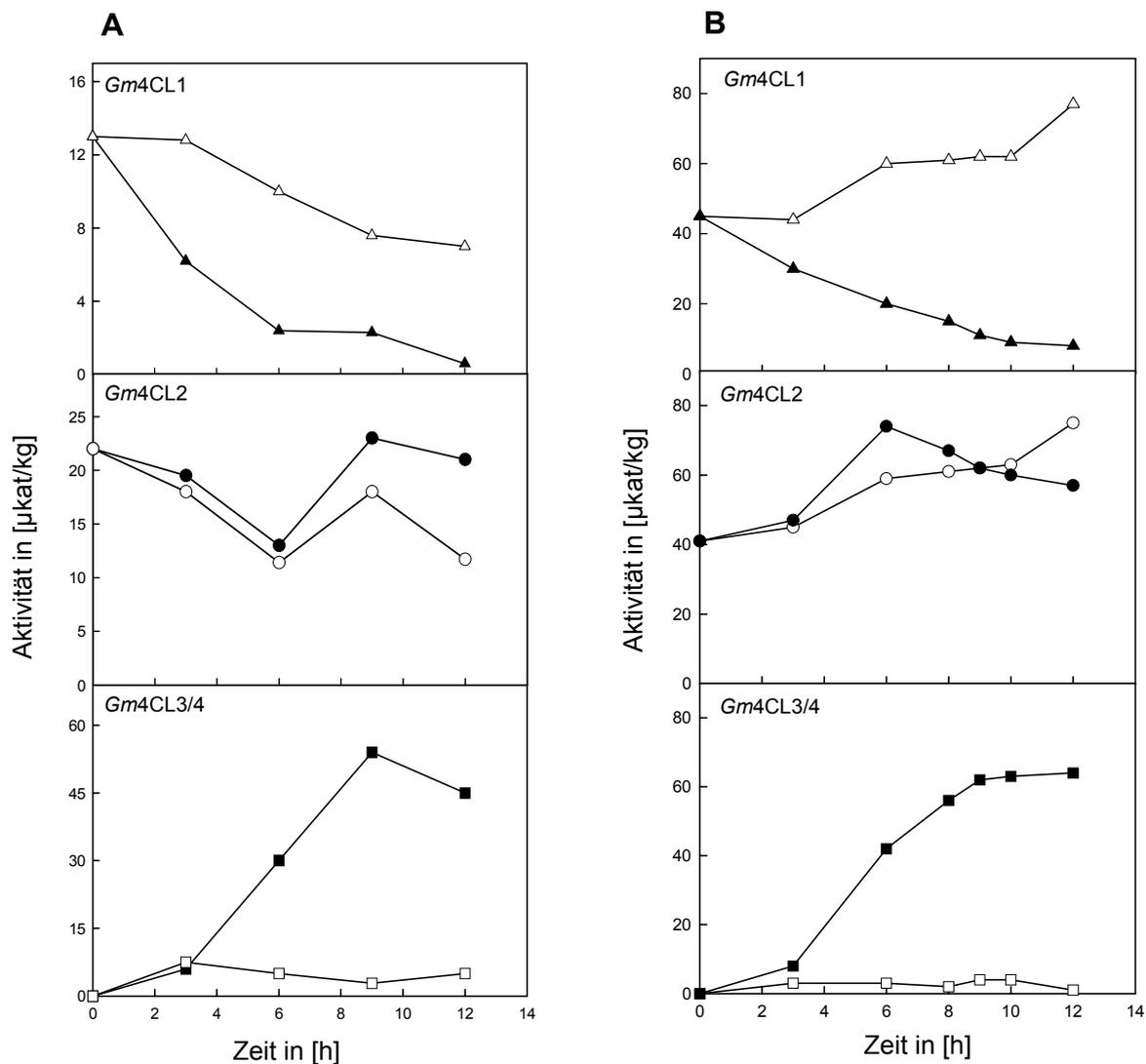


Abb. 14: Aktivitätsänderung der *Gm4CL*-Isoformen nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen aus den Wachstumsstadien I (A) und II (B). Sojabohnenzellkulturen aus den Wachstumsstadien I und II (Hille et al., 1982) wurden mit β -Glucan-Rohelicitor von *P. sojae* (80 μ g Glucoseäquivalente/ml; dunkle Symbole) oder Wasser (helle Symbole) behandelt und nach den angegebenen Zeiten geerntet. Im spektralphotometrischen Test wurde die *Gm4CL*-Aktivität im Proteinrohextrakt gemessen. Die rechnerische Ermittlung der in den Abbildungen angegebenen Aktivitäten der *Gm4CL*-Isoformen bzgl. 4-Cumarsäure erfolgte nach der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen Methode.

Um festzustellen, ob die Regulation der *Gm4CL*-Isoformen nach Elicitorbehandlung von Sojabohnenzellkulturen auf transkriptioneller oder translationaler Ebene stattfindet, wurde die Menge der Transkripte der *Gm4CL*-Isoformen untersucht (Abb. 15). In den Kontrollzellen

konnte nur mRNA der *Gm4CL1* und *Gm4CL2* detektiert werden, während keine *Gm4CL3/4*-Transkripte vorhanden waren. Nach Elicitierung der Sojabohnenzellen kam es zu einem Absinken des mRNA-Pegels der *Gm4CL1*, so daß nach 10 h keine *Gm4CL1*-Transkripte mehr nachgewiesen werden konnten. Die Menge der mRNA der *Gm4CL2* blieb von der Elicitorbehandlung nahezu unbeeinträchtigt, während die Menge der *Gm4CL3/4*-mRNAs stark anstieg. Bereits 4 h nach der Elicitorzugabe hatte die mRNA-Menge der *Gm4CL3/4* das Maximum erreicht. Obwohl weder bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten noch bei der Analyse der mRNA-Mengen zwischen *Gm4CL3* und *Gm4CL4* unterschieden werden konnte, kann dennoch davon ausgegangen werden, daß nach Elicitierung der Sojabohnenzellkulturen beide Isoformen induziert wurden, da sowohl die *Gm4CL3*- als auch die *Gm4CL4*-cDNA aus induzierten Zellen isoliert wurden (Kapitel 3.1.6 und Uhlmann und Ebel, 1993; Möllers, 1997).

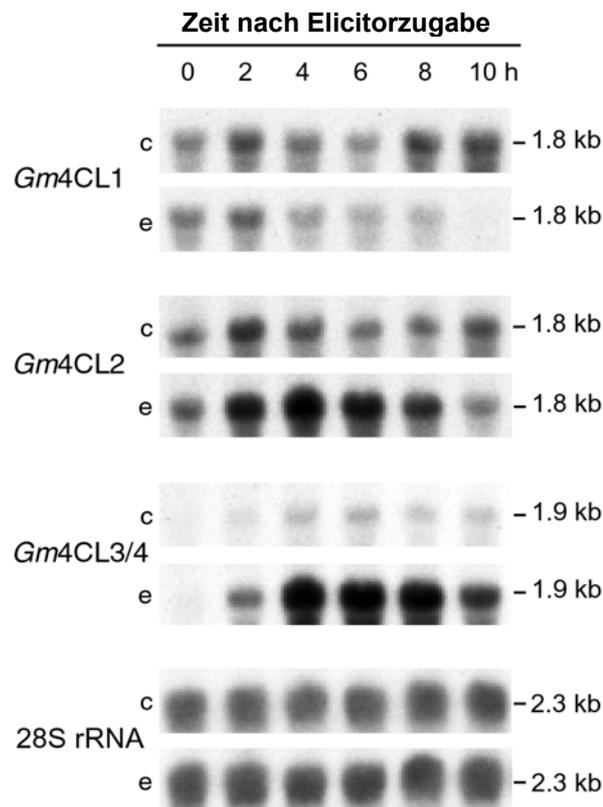


Abb. 15: Differentielle Expression der *Gm4CL*-Gene nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen. Sojabohnenzellkulturen aus dem Wachstumsstadium II (Hille et al., 1982) wurden mit β -Glucan-Rohelicitor von *P. sojae* (80 μ g Glucoseäquivalente/ml) oder Wasser behandelt und nach den angegebenen Zeiten geerntet. Jeweils 20 μ g Gesamt-RNA der elicitierten Zellen (e) und der Kontrollzellen (c) wurden in einem 1,2%igem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit genspezifischen Sonden für *Gm4CL1*, *Gm4CL2* und *Gm4CL3/4* hybridisiert und unter hoch stringenten Bedingungen (0,1 x SSC, 65°C, 30 min) gewaschen. Als Ladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer für 28S-rRNA-spezifischen Sonde durchgeführt. Die Größe der hybridisierenden RNAs ist rechts angegeben.

3.1.13 Expression der *Gm4CL*-Isogene in Sojabohnekeimwurzeln nach Infektion mit *Phytophthora sojae* Rasse 1

Um zu untersuchen, wie die Sojabohne-4CL-Isoformen bei einer natürlichen Infektion reguliert werden, wurden drei Tage alte Sojabohnekeimwurzeln über einen Zeitraum von 24 h mit Zoosporen des Wurzelpathogens *Phytophthora sojae* Rasse 1 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA aus den Keimwurzeln isoliert und hinsichtlich der mRNA-Pegel von *Gm4CL1*, *Gm4CL2* und *Gm4CL3/4* analysiert (Abb. 16). Wie im Zellkultur-Experiment blieb auch hier die Menge der Transkripte für *Gm4CL2* von der Infektion unbeeinträchtigt. Transkripte von *Gm4CL3/4* mRNA wurden nur in der infizierten Wurzel detektiert. Ob eine Reduktion der *Gm4CL1*-Transkription nach Infektion der Keimwurzeln eintritt, konnte nicht gezeigt werden, da in den drei Tage alten Sojabohnekeimwurzeln nur eine sehr geringe Menge an *Gm4CL1*-Transkripten nachweisbar war.

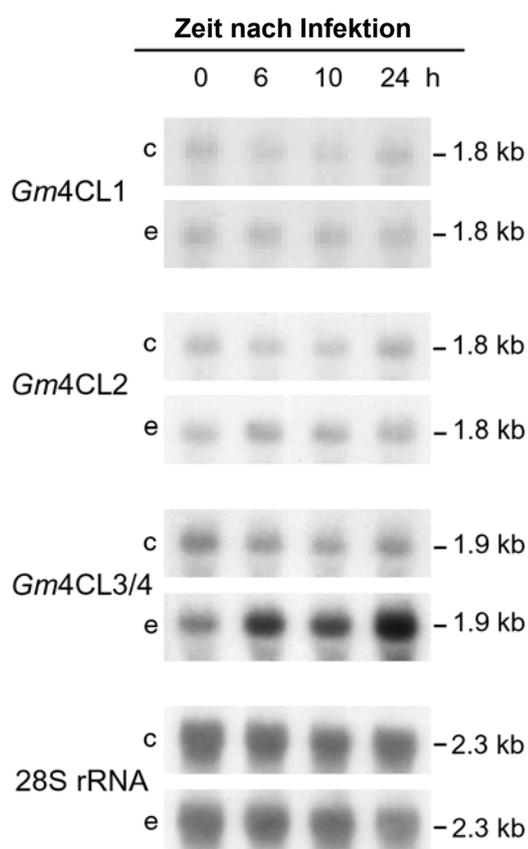


Abb. 16: Differentielle Expression der *Gm4CL*-Gene nach Infektion von Sojabohnekeimwurzeln mit *P. sojae*. Wurzeln von drei Tage alten Sojabohnekeimlingen (cv. Harosoy 63) wurden mit Zoosporen von *P. sojae* Rasse 1 (e) oder Wasser (c) behandelt und nach den angegebenen Zeiten geerntet. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA wurden in einem 1,2%igem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit genspezifischen Sonden für *Gm4CL1*, *Gm4CL2* und *Gm4CL3/4* hybridisiert und unter hoch stringenten Bedingungen (0,1 x SSC, 65°C, 30 min) gewaschen. Als Ladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer für 28S-rRNA-spezifischen Sonde durchgeführt. Die Größe der hybridisierenden RNAs ist rechts angegeben.

3.2 Biochemische Charakterisierung der *Gm4CL*-Isoformen

3.2.1 Heterologe Expression der *Gm4CL*-cDNAs

4CL-Proteine wurden bereits in Bakterienzellen (Lee und Douglas, 1996; Möllers, 1997; Hu et al., 1998; Ehlting et al., 1999) und Insektenzellen (Allina et al., 1998) funktionell synthetisiert. Für die Produktion der Sojabohne-4CLs wurde das bakterielle Expressionssystem ausgewählt, da es einfacher Hand zu haben ist als das Insektenzell-System und da Möllers die *Gm4CL*-Isoformen 2 und 3 in Bakterienzellen bereits erfolgreich synthetisieren konnte (Möllers, 1997). Als Expressionsvektor wurde pQE verwendet, der sich bereits mehrfach bewährt hatte (Lee und Douglas, 1996; Möllers, 1997; Hu et al., 1998; Ehlting et al., 1999).

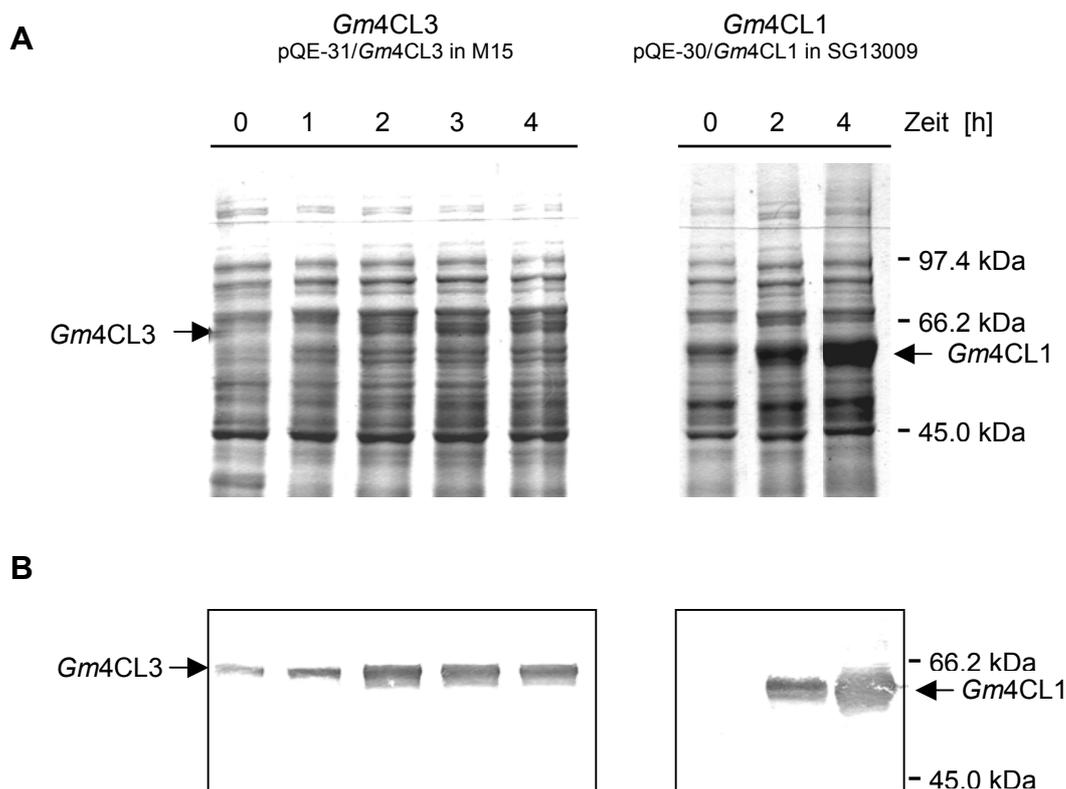


Abb. 17: Expressionskinetik der rekombinanten *Gm4CL1* und *Gm4CL3*.

Die Produktion der rekombinanten 4CL-Isoformen 1 und 3 erfolgte im pQE-Expressionssystem als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Histidin-Hexamer. Nach der Induktion der Expression mit IPTG (0 h) wurde zu den angegebenen Zeiten aus den Bakterienkulturen ein Aliquot entsprechend der Menge von 1 OD_{600nm} zur Proteinextraktion entnommen. Jeweils 1/10 der bakteriellen Proteinrohextrakte wurde in einem 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (A) oder auf ein Nitrocellulosemembran übertragen und zur Immunodetektion mit einem gegen Petersilie-4CL gerichteten Antiserum (Ragg et al., 1981) inkubiert (B). Die relativen Molekularmassen der Standardproteine sind rechts angegeben.

Wie bereits erwähnt, wurde von Möllers (1997) *Gm4CL2* und *Gm4CL3* funktionell in *E. coli* synthetisiert und biochemisch charakterisiert. Allerdings wurde zur Expression der *Gm4CL2*-cDNA der Vektor pQE30 und zur Expression der *Gm4CL3*-cDNA der Vektor pTrcHisB verwendet. Dies führte dazu, daß die beiden produzierten Proteine mit unterschiedlich langen aminoterminalen Anhängen versehen wurden (7 AS bei *Gm4CL2*, 45 AS bei *Gm4CL3*). Da die ermittelten enzymatischen Daten aller 4CL-Isoformen aus Sojabohne untereinander verglichen werden sollten, mußte sichergestellt werden, daß die unterschiedlich langen N-terminalen Anhänge die katalytischen Eigenschaften der rekombinanten Proteine nicht (unterschiedlich stark) beeinträchtigen. Zur Vervollständigung der enzymatischen Daten der *Gm4CL2* und *Gm4CL3* und zur biochemischen Charakterisierung der *Gm4CL1* und *Gm4CL4* wurden alle vier 4CL-Isoformen der Sojabohne in *E. coli* in IPTG-induzierbaren pQE-Expressionsvektoren als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Histidin-Hexamer synthetisiert.

Da zu lange Induktionszeiten oft zur Bildung von Einschußkörpern oder zum Proteinabbau in den Bakterienzellen führen, wurde eine Expressionskinetik über einen Zeitraum von vier Stunden erstellt, um die optimale Induktionsdauer für das Expressionssystem zu ermitteln. Für diesen Versuch wurde die Produktion der *Gm4CL1* und *Gm4CL3* stellvertretend für alle vier Sojabohne-4CLs verfolgt. *Gm4CL1* wurde im *E. coli*-Stamm SG13009 synthetisiert, *Gm4CL3* im schwächer produzierenden *E. coli*-Stamm M15. Nach Induktion der Expression mit IPTG (0 h) ist eine verstärkte Synthese der rekombinanten *Gm4CL3* bis zu einer Expressionszeit von 2 h zu beobachten, während die rekombinante *Gm4CL1* auch nach dieser Zeit noch eine Produktionssteigerung erfuhr (Abb. 17). Somit wurde für alle weiteren Syntheseversuche der *Gm4CL*-Isoformen unabhängig vom verwendeten *E. coli*-Stamm eine Induktionsdauer von drei Stunden eingehalten.

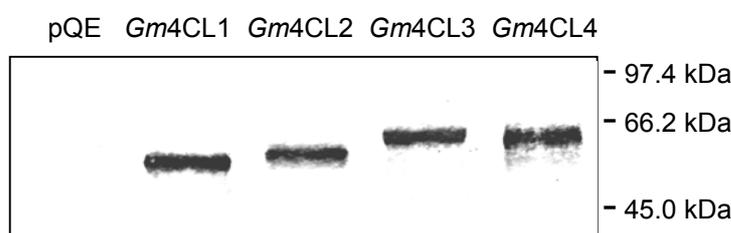


Abb. 18: Western-Blot-Analyse der rekombinanten *Gm4CL*-Isoformen.

Die vier *Gm4CL*-Isoformen wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Histidin-Hexamer synthetisiert und mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Jeweils ca. 2 µg der gereinigten Proteine wurden in einem 10%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Immunodetektion wurde mit einem gegen Petersilie-4CL gerichteten Antiserum (Ragg et al., 1981) in einer 1:20000 Verdünnung durchgeführt. Proteinextrakt von Bakterien, die einen leeren Expressionvektor (pQE) enthielten, diente als Kontrolle. Die relativen Molekularmassen von Markerproteinen sind rechts angegeben.

Aufgrund ihrer N-terminalen Histidin-Sequenz konnten die rekombinanten Proteine aus bakteriellen Rohextrakten mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie angereichert werden. Im SDS-Polyacrylamidgel wanderten die heterolog synthetisierten Enzyme entsprechend ihres vorhergesagten Molekulargewichts und interagierten im immunologischen Nachweis mit einem gegen Petersilie-4CL gerichteten Antiserum (Ragg et al., 1981) (Abb. 18). Im bakteriellen Extrakt mit leerem Expressionsvektor zeigte kein Protein eine Kreuzreaktion mit dem Antiserum.

3.2.2 Katalytische Eigenschaften der rekombinanten *Gm4CL1*

Die rekombinante *Gm4CL1* war in der Lage, Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure umzusetzen (Tab. 7). Die Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration folgte jeweils einer Michaelis-Menten-Kinetik (Anhang A5). Die *Gm4CL1* zeigte hohe Affinitäten zu Ferulasäure ($K_m = 6 \mu\text{M}$), Sinapinsäure ($K_m = 7 \mu\text{M}$), 4-Cumarsäure ($K_m = 22 \mu\text{M}$) und Kaffeesäure ($K_m = 40 \mu\text{M}$) und auch zum synthetischen Substrat 3,4-Dimethoxyzimtsäure ($K_m = 60 \mu\text{M}$). Zimtsäure ($K_m = 4400 \mu\text{M}$) konnte nur sehr schwach umgesetzt werden. Hohe katalytische Wirksamkeit (rel. V_{\max}/K_m) zeigte die *Gm4CL1* vor allem gegenüber Ferulasäure ($9,50 \mu\text{M}^{-1}$), Sinapinsäure ($5,00 \mu\text{M}^{-1}$) und 4-Cumarsäure ($4,54 \mu\text{M}^{-1}$).

Die ermittelten K_m -Werte der rekombinanten *Gm4CL1* stimmten gut mit den Werten der von Knobloch und Hahlbrock (1975) partiell gereinigten *Gm4CL1* überein. Dadurch wurde bestätigt, daß es sich bei der isolierten *Gm4CL1*-cDNA um die kodierende Sequenz der Ligase 1 handelte.

3.2.3 Katalytische Eigenschaften der rekombinanten *Gm4CL4*

Die in *E. coli* produzierte *Gm4CL4* war in der Lage, Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure zu aktivieren (Tab. 7). Die Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration folgte jeweils einer Michaelis-Menten-Kinetik (Anhang A5). Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure konnten nicht umgesetzt werden. Die *Gm4CL4* besaß somit das gleiche Substratsspektrum wie die strukturell sehr nahe verwandte *Gm4CL3* (Möllers, 1997). *Gm4CL4* zeigte hohe Affinität zu 4-Cumarsäure ($K_m = 10 \mu\text{M}$) und Kaffeesäure ($K_m = 34 \mu\text{M}$), während Zimtsäure ($K_m = 300 \mu\text{M}$) und Ferulasäure ($K_m = 1800 \mu\text{M}$) nur schwach umgesetzt wurden. Die höchste katalytische Wirksamkeit (rel. V_{\max}/K_m) wies das Enzym gegenüber 4-Cumarsäure auf.

Tab. 7: Kinetische Eigenschaften der rekombinanten Sojabohne-4CLs.

Isoform	Substrat	K _m		Relatives V _{max}		Relatives V _{max} /K _m
		[μM]		[% von Cumarsäure]		[1/μM]
<i>Gm4CL1</i>	Zimtsäure	4400	(1300)	9	(3)	2.0x10 ⁻³
	4-Cumarsäure	22	(32)	100	(100)	4.54
	Kaffeesäure	40	(40)	40	(56)	1.00
	Ferulasäure	6	(9)	57	(56)	9.50
	Sinapinsäure	7	(11)	32	(46)	5.60
	3,4-Dimethoxyzimtsäure	60	(100)	75	(89)	1.25
<i>Gm4CL2</i>	Zimtsäure	1980	(4500)	72	(23)	0.04
	4-Cumarsäure	42	(17)	100	(100)	2.38
	Kaffeesäure	13	(14)	37	(87)	2.85
	Ferulasäure	140	(130)	71	(96)	0.51
	Sinapinsäure	n.u.	(n.u.)	-	-	-
	3,4-Dimethoxyzimtsäure	n.u.	(n.u.)	-	-	-
<i>Gm4CL3</i>	Zimtsäure	980		45		0.05
	4-Cumarsäure	9		100		11.12
	Kaffeesäure	50		74		1.48
	Ferulasäure	3100		25		8.1x10 ⁻³
	Sinapinsäure	n.u.		-		-
	3,4-Dimethoxyzimtsäure	n.u.		-		-
<i>Gm4CL4</i>	Zimtsäure	300		20		0.07
	4-Cumarsäure	6		100		16.00
	Kaffeesäure	38		50		1.32
	Ferulasäure	1800		35		0.02
	Sinapinsäure	n.u.		-		-
	3,4-Dimethoxyzimtsäure	n.u.		-		-

Die K_m- und V_{max}-Werte der rekombinanten *Gm4CL1* und *Gm4CL4* sowie die Werte für Zimtsäure von *Gm4CL2* und *Gm4CL3* wurden mit Hilfe der Regressionsgleichung für rechtwinklige Hyperbeln mit mindestens sechs Meßpunkten ermittelt. Die kinetischen Daten der rekombinanten *Gm4CL2* und *Gm4CL3* für 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure wurden von Möllers (1997) übernommen. Die relativen V_{max}-Werte sind in Bezug auf den Wert für 4-Cumarsäure (100%) angegeben. Alle ermittelten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen. In Klammern sind die von Knobloch und Hahlbrock (1975) ermittelten Werte der partiell gereinigten Ligasen 1 und 2 angegeben. n.u., nicht umgesetzt.

3.2.4 Vervollständigung der katalytischen Daten der rekombinanten *Gm4CL2* und *Gm4CL3*

Die *Gm4CL*-Isoformen 2 und 3 wurden erneut funktionell synthetisiert. Die rekombinante *Gm4CL3* - produziert mit dem pQE-Vektor - zeigte die identische Substratspezifität wie die von Möllers (1997) mit dem Expressionsvektor pTrcHisB synthetisierte Form. 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure wurden jeweils als Substrat akzeptiert, während Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure nicht umgesetzt werden konnten. Außerdem stimmte der K_m-Wert für 4-Cumarsäure (15 μM) gut mit dem von Möllers ermittelten Wert (9 μM) überein, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Verwendung der verschiedenen Vektorsysteme

(pQE bzw. pTrcHisB) zur Produktion der *Gm4CL3* keinen Einfluß auf die enzymatischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins hatte und daß die von Möllers (1997) für *Gm4CL3* ermittelten Werte mit den hier erarbeiteten Daten verglichen werden konnten.

Außerdem wurde die Affinität der *Gm4CL2* und *Gm4CL3* gegenüber Zimtsäure ermittelt, da diese Daten noch nicht vorlagen. Die Abhängigkeit der enzymatische Aktivität der rekombinanten *Gm4CL2* und *Gm4CL3* von der Zimtsäurekonzentration folgte jeweils einer Michaelis-Menten-Kinetik (Anhang A5). Die Michaelis-Menten-Konstante für Zimtsäure betrug für *Gm4CL2* 1980 μM und für *Gm4CL3* 980 μM (Tab. 7). Beide Isoformen zeigten eine sehr geringe katalytische Wirksamkeit (rel. V_{max}/K_m) von 0,03 μM^{-1} (*Gm4CL2*) bzw. 0,04 μM^{-1} (*Gm4CL3*) gegenüber Zimtsäure.

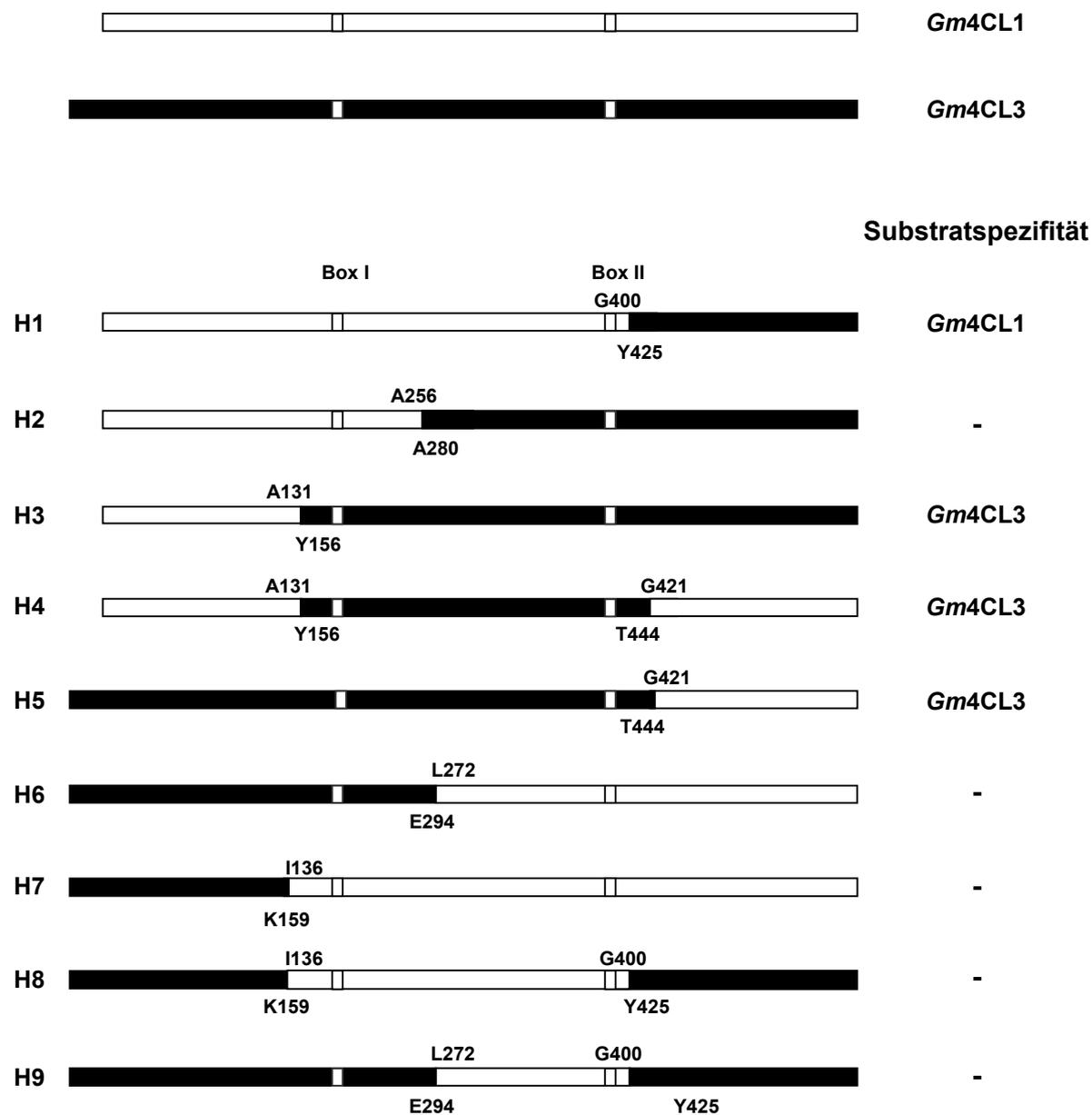
3.2.5 Identifizierung von Sequenzbereichen, die die Substratspezifität der 4CL bestimmen

Mit Hilfe von *Gm4CL*-Hybridmolekülen sollten Sequenzbereiche identifiziert werden, in denen die Substratspezifität der 4CL determiniert wird (*Substratspezifität-determinierende Region*, SdR). Für die Herstellung der 4CL-Hybriden wurden *Gm4CL1* und *Gm4CL3* benutzt, da sich beide Isoformen in ihrem Substratspektrum deutlich unterschieden (Tab. 7). Während *Gm4CL1* 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure, 3,4-Dimethoxyzimtsäure und in geringem Maß auch Zimtsäure als Substrate akzeptierte, zeigte *Gm4CL3* nur mit Zimtsäure, 4-Cumarsäure und Kaffeesäure deutliche Aktivität. Ferulasäure wird von *Gm4CL3* nur sehr schwach umgesetzt. Außerdem enthielt die cDNA beider Isoformen geeignete Restriktionschnittstellen, um die gewünschten Hybridformen herzustellen. Durch Austausch verschiedener Sequenzabschnitte zwischen *Gm4CL1* und *Gm4CL3* wurden verschiedene 4CL-Hybridmoleküle hergestellt (H1-H9, Abb. 19A). Die Produktion der Hybridformen wurde mittels Western-Blot-Analyse mit dem gegen Petersilie-4CL gerichteten Antiserum nachgewiesen (Abb. 19B). Zur Ermittlung der Substratspezifitäten der 4CL-Hybriden wurde ihre Aktivität gegenüber Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure im spektralphotometrischen Test gemessen (Tab. 8).

Bei den Hybriden H1, H2 und H3 waren verschieden große Teile des N-Terminus der *Gm4CL1* mit den jeweils fehlenden C-terminalen Teilen der *Gm4CL3* fusioniert. Besaß die Hybride 70% des N-Terminus der *Gm4CL1* (M1-G400) und 30% des C-Terminus der *Gm4CL3* (Y425-P570) (H1), zeigte sie die gleiche Substratspezifität wie *Gm4CL1* (Tab. 8). Folglich wurde die Substratspezifität der *Gm4CL1* durch die N-terminalen 70% der Aminosäuresequenz bestimmt. Die Hybride H2 setzte sich aus 40% des N-Terminus der *Gm4CL1* (M1-A256) und 60% des C-terminalen Teil der *Gm4CL3* (A280-P570) zusammen. Diese 4CL-Hybridmoleküle konnten keines der angebotenen Zimtsäurederivate umsetzen.

A

50AS
|-----|



B

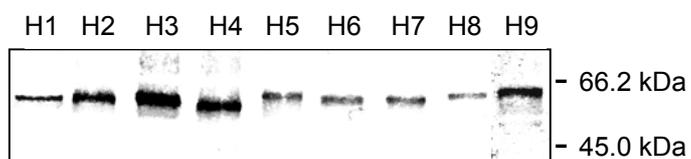


Abb. 19: *Gm4CL1/Gm4CL3*-Hybridproteine (H1-H9).

A) Schematische Darstellung der *Gm4CL1/Gm4CL3*-Hybridproteine (H1-H9).

Die Proteinstruktur der *Gm4CL1* ist weiß, die Struktur der *Gm4CL3* schwarz dargestellt. Die innerhalb der Adenylat-bildenden Enzyme konservierten Boxen I und II sind durch weiße Kästchen markiert. Die Substratspezifität der Hybridenzyme ist rechts angegeben. (-) bedeutet, daß die Hybridform keine Aktivität gegenüber einem der eingesetzten Zimtsäurederivate zeigte. Die Aminosäuren an den Fusionspunkten sind über (*Gm4CL1*) bzw. unter (*Gm4CL3*) den einzelnen Schemata angegeben. Die *Gm4CL1/Gm4CL3*-Hybriden sind aus folgenden Fragmenten hergestellt worden:

H1: *Gm4CL1*_{M1-G400}::*Gm4CL3*_{Y425-P570}

H2: *Gm4CL1*_{M1-A256}::*Gm4CL3*_{A280-P570}

H3: *Gm4CL1*_{M1-A131}::*Gm4CL3*_{Y156-P570}

H4: *Gm4CL1*_{M1-A131}::*Gm4CL3*_{Y156-T444}::*Gm4CL1*_{G421-N546}

H5: *Gm4CL3*_{M1-T444}::*Gm4CL1*_{G421-N546}

H6: *Gm4CL3*_{M1-E294}::*Gm4CL1*_{L272-N546}

H7: *Gm4CL3*_{M1-K159}::*Gm4CL1*_{I136-N546}

H8: *Gm4CL3*_{M1-K159}::*Gm4CL1*_{I136-G400}::*Gm4CL3*_{Y425-P570}

H9: *Gm4CL3*_{M1-E294}::*Gm4CL1*_{L272-G400}::*Gm4CL3*_{Y425-P570}

B) Immunologischer Nachweis der Produktion der *Gm4CL1/Gm4CL3*-Hybridproteine.

Jeweils 15 µg bakterieller Rohextrakt mit den heterolog synthetisierten Hybriden wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunologische Nachweis der *Gm4CL*-Hybriden erfolgten mit einem gegen Petersilie-4CL gerichtetem Antiserum (Ragg et al., 1981). Nach Anlagerung eines sekundären Antikörpers, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, wurde der Antigen-Antikörper-Komplex mittels Farbreaktion nachgewiesen. Die relativen Molekularmassen von Standardproteinen sind rechts angegeben.

Wurden 25% des N-Terminus der *Gm4CL1* (M1-A131) mit 75% des C-Terminus der *Gm4CL3* (Y156-P570) fusioniert (H3), zeigten die rekombinanten 4CL-Hybridproteine die Substratspezifität der *Gm4CL3*. Zusammen mit den Erkenntnisse der Hybride H1 bedeutete dies, daß die Substratspezifität der *Gm4CL3* im Bereich zwischen 25 - 70% des N-Terminus determiniert wird. Bestätigt wurde dies Vermutung mit der Hybride H4. Sie bestand aus dem zentralen Bereich der *Gm4CL3* (Y156-T444), der vom N-Terminus (M1-A131) und C-Terminus (G421-N546) der *Gm4CL1* flankiert wurde. Erwartungsgemäß setzte diese Hybridform das gleiche Substratspektrum um wie *Gm4CL3*.

Vier weitere Hybriden wurden hergestellt, bei denen die Sequenzen der *Gm4CL1* und *Gm4CL3* im Vergleich zu H1, H2, H3 und H4 in umgekehrter Weise kombiniert wurden (H5-H8). Bei H5 wurde 70% des N-Terminus der *Gm4CL3* mit 30% des C-Terminus der *Gm4CL1* fusioniert. Das Substratspektrum dieser Hybride glich dem der *Gm4CL3*. Wie bei H1 wurde auch hier die Substratspezifität nicht durch den Austausch des C-terminalen Teils beeinflußt. Die Hybride H6 bestand aus 50% des N-Terminus der *Gm4CL3* (M1-E294) und 50% des C-Terminus der *Gm4CL1* (L272-N546). Sie war, wie die Hybride mit umgekehrter Sequenzkombination (H2), nicht in der Lage, die angebotenen Zimtsäurederivate umzusetzen. Die Hybride, die aus 25% des N-Terminus der *Gm4CL3* (M1-K159) und 75% des C-terminalen Teils der *Gm4CL1* (I136-N546) zusammengesetzt war (H7), zeigte keine 4CL-Aktivität. Vermutlich beeinträchtigte der etwas längere N-Terminus des *Gm4CL3*-Fragmentes die Ausbildung einer aktiven 4CL-Hybride. Die Hybride H8 beinhaltete den zentralen Bereich der *Gm4CL1* (I136-G400), der vom N-Terminus (M1-K159) und C-

Terminus (Y425-P570) der *Gm4CL3* flankiert wurde. Auch dieses 4CL-Hybridprotein zeigte möglicherweise aufgrund des längeren N-Terminus keine 4CL-Aktivität. Gleiches galt auch für die Hybride H9. Sie bestand aus einem kleineren zentralen *Gm4CL1*-Abschnitt (L272-G400) als die Hybride H8 und dem N-Terminus (M1-E294) und C-Terminus der *Gm4CL3* (Y425-P570). Obwohl die Hybriden H7 und H8 nicht die erwarteten Ergebnisse lieferten, wurde letztendlich vor allem aufgrund der Ergebnisse der Hybriden H1, H3 und H4 davon ausgegangen, daß die Substratspezifität der 4CL im zentralen Sequenzbereich des Proteins mit den Boxen I und II determiniert wird.

Tab. 8: Substratspezifitäten der *Gm4CL1/Gm4CL3*-Hybridenzyme (H1-H9).

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
	[µkat/kg]								
Zimtsäure	3.2	-	240	183	12.6	-	-	-	-
4-Cumarsäure	147	-	2170	900	60	-	-	-	-
Kaffeesäure	36	-	540	162	20	-	-	-	-
Ferulasäure	54	-	2.6	-	-	-	-	-	-
Sinapinsäure	31	-	-	-	-	-	-	-	-
3,4-DMZ	93	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Hybridproteine wurden im *E. coli*-Stamm SG13009 synthetisiert. Zur Bestimmung der Substratspezifitäten der Hybridenzyme wurde bakterieller Rohextrakt im spektralphotometrische 4CL-Aktivitätstest eingesetzt. Der Umsatz folgender Zimtsäurederivate wurden gemessen: Zimtsäure (2000 µM), 4-Cumarsäure (500 µM), Kaffeesäure (500 µM), Ferulasäure (100 µM), Sinapinsäure (500 µM) und 3,4-Dimethoxyzimtsäure (500 µM). (-) bedeutet: kein Substratumsatz meßbar.

3.2.6 Peptidmotive innerhalb der SdR, die möglicherweise an der Bindung der Zimtsäurederivate beteiligt sind

Durch den Vergleich von 4CL-Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Pflanzen konnten innerhalb der SdR acht konservierte Sequenzbereiche identifiziert werden, die potentielle Substratbindemotive der 4CL darstellten (Anhang A4, Abb.20). Die beiden äußeren Motive entsprechen den Boxen I (M1) und II (M8). Nähere Hinweise, welche der konservierten Motive der SdR tatsächlich an der Substratbindung beteiligt sind, lieferten die Kristallstrukturen der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase (PheA) aus *Brevibacillus brevis* und der Luciferase aus *Photinus pyralis*. Beide sind Adenylat-bildende Enzyme, die trotz der geringen Identität ihrer Aminosäuresequenzen (18%) zahlreiche Gemeinsamkeiten in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen (Conti et al., 1997). Sie sind jeweils aus einer größeren N-terminalen Domäne und einer kleineren C-terminalen Domäne aufgebaut (Abb. 21A und B). Da PheA im Komplex mit AMP und L-Phenylalanin kristallisiert wurde, konnten die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Die Substratbindetasche war in der N-terminalen Domäne am Übergang zur C-terminalen Domäne lokalisiert (Abb. 21A).

Die Luciferase wurde ohne einen Liganden kristallisiert, so daß die Lage ihrer Substratbindetasche nicht bekannt ist. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von Luciferase und PheA wurden die den Substratbindetasche-bildenden Aminosäuren der PheA homologen Aminosäuren der Luciferase identifiziert (Abb. 21D). In der dreidimensionalen Struktur der Luciferase liegen diese korrespondierenden Aminosäuren, ebenso wie bei PheA, am Übergang zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne und markieren somit die mögliche Substratbindetasche der Luciferase (Abb. 21B).

4CL gehört ebenfalls zur Gruppe der Adenylat-bildenden Enzyme. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der *Gm4CL1*, PheA und Luciferase zeigte, daß die verschiedenen Enzyme konservierte Bereiche besitzen, die auf eine strukturelle Verwandtschaft dieser Enzyme hindeuteten (Abb. 21D). Aufgrund der Sequenzidentität von 33% zwischen *Gm4CL1* und Luciferase war es möglich, ein Strukturmodell der *Gm4CL1* zu erstellen, wobei die Kristallstruktur der Luciferase als Matrize diente. Die mögliche Substratbindetasche befand sich auch hier am Übergang zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne (Abb. 21C).

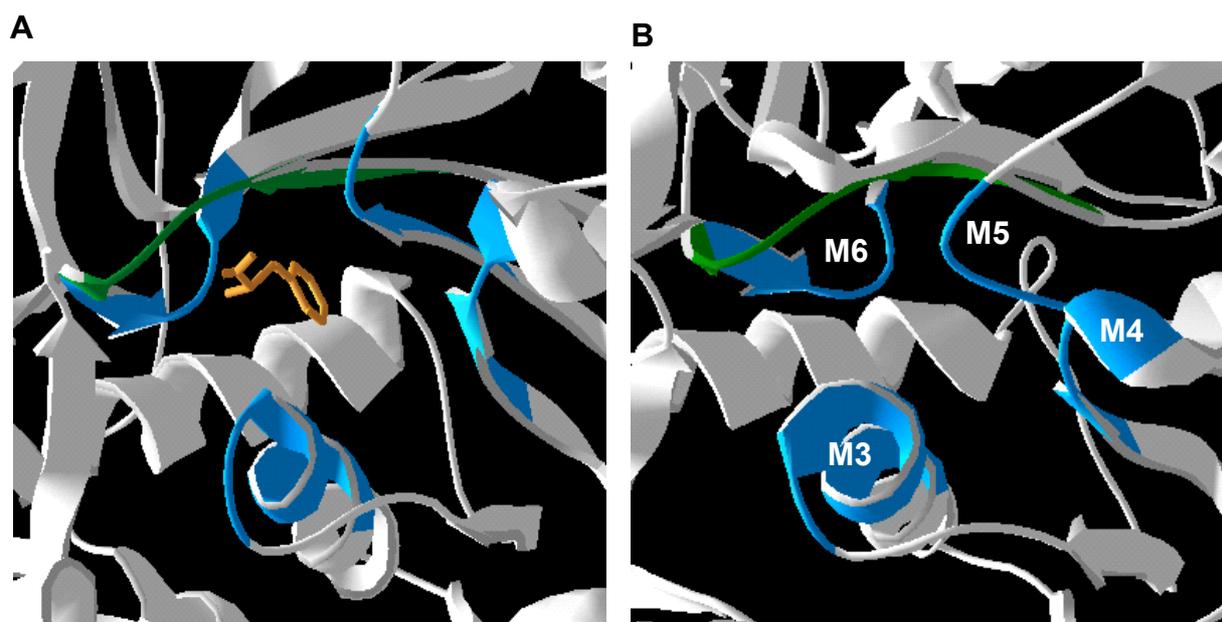


Abb. 23: Vergleich der Substratbindetasche der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase (PheA) aus *Brevibacterium brevis* (A) mit der putativen Substratbindetasche der *Gm4CL1* (B).

Die Vorhersage der Molekülstruktur der *Gm4CL1* wurde mit dem Programm SWISS-MODEL (Peitsch, 1996; Guex et al., 1999) mit der Struktur der Luciferase als Matrize durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm spdbViewer (Peitsch, 1996; Guex et al., 1999). Zur besseren Einsicht in die Substratbindetasche der PheA wurden die Aminosäuren 511-522 entfernt. In der Struktur der Gramacidin-S-Synthetase ist die Phenylalanin-Bindetasche blau markiert. Grün ist ein Teil der AMP-Bindetasche dargestellt. Die zur Substratbindetasche der Gramacidin-S-Synthetase homologen Bereiche der *Gm4CL1* sind im Strukturmodell der *Gm4CL1* mit den gleichen Farben markiert (M3-M6).

Hohe Ähnlichkeiten zeigten Luciferase und PheA vor allem zu den Motiven M1 (mögliches AMP-Bindemotiv), M4, M6 und M8 der 4CLs. Zudem waren diese Motive in den Sequenzen von Luciferase, PheA und 4CL annähernd gleich weit voneinander entfernt (Abb. 22).

Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeiten wurde vermutet, daß bei PheA, Luciferase und 4CL analoge Sequenzmotive für die Substratbindung verantwortlich sind. In PheA sind die Aminosäuren, die für die Bindung von Phenylalanin verantwortlich sind, im Bereich zwischen den Motiven M1 und M8 lokalisiert (Conti et al., 1997; Anhang A6). In 4CL ist diese Region Bestandteil der identifizierten SdR (Abb. 20). Die zu den Substrat-bindenden Aminosäuren der PheA homologen Aminosäuren der 4CL sind in den Motiven M3, M5 und M6 und in direkter Nachbarschaft von M4 lokalisiert (Abb. 22). Folglich bilden diese vier Motive die mögliche Zimtsäurebindetasche der 4CL (Abb. 23).

3.2.7 „Alaninscanning“-Mutagenese zweier möglicher Substratbindedomänen der *Gm4CL1*

Die Aminosäuren VPP des Motivs M4 und das Motiv M6 (GQGYGMTEAGP[V]L) wurden bei *Gm4CL1* hinsichtlich ihrer Zimtsäure-bindenden Eigenschaften näher untersucht. Beide Motive sind bei allen bisher klonierten 4CLs konserviert. Eine Ausnahme bildet lediglich das Valin in M6, welches bei *Gm4CL1* nicht vorhanden ist. Zudem ist das erste Prolin im Motiv M4 und die Aminosäurefolge YG-TE des Motivs M6 bei nahezu allen Adenylat-bildenden Enzymen konserviert (Anhang A7). Mit einbezogen in die Untersuchungen wurden auch den beiden Motiven benachbarte Aminosäuren (Motiv M4: Phe283; Motiv M6: Thr331, Ile346, Met348).

Die Analysen wurden durch die „Alaninscanning“-Mutagenese ermöglicht. Diese Methode hat sich bereits mehrfach bei der systematischen Untersuchung funktionell wichtiger Aminosäuren bewährt (Cunningham und Wells, 1989; Wells, 1991). Da durch das Ersetzen der Aminosäuren durch Alanin alle Seitenkettenatome nach dem β -Kohlenstoffatom entfernt werden, können aus dem Effekt der einzelnen Alanin-Mutationen Kenntnisse über die Funktion der jeweiligen Seitenkette gewonnen werden. Die „Alaninscanning“-Mutagenese kann somit Hinweise auf Interaktionen zwischen Protein und Substrat liefern. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, daß die eingeführten Mutationen auch strukturelle Veränderungen des Proteins verursachen können, die die Enzymaktivität beeinträchtigen und die Interpretation der Versuchsergebnisse erschweren können.

Die verschiedenen *Gm4CL1*-Mutationen wurden mittels *in-vitro*-PCR-Mutagenese mit pQE-30/*Gm4CL1* als Matrize hergestellt und durch Sequenzierung überprüft. Die Produktion der *Gm4CL1*-Mutanten wurde mit einem gegen Petersilie-4CL gerichteten Antiserum immunologisch nachgewiesen (Abb. 24A). Die Mutanten *Gm4CL1*/F283A und *Gm4CL1*/G335A konnten nicht synthetisiert werden. Wie vorher bereits erörtert, akzeptiert die Wildtyp-*Gm4CL1* (*Gm4CL1*/WT) 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure, 3,4-Dimethoxyzimtsäure und in geringem Maß auch Zimtsäure als Substrate. Die Aktivitäten der *Gm4CL1*-Mutanten gegenüber diesen Substraten sind in Abbildung 24B dargestellt.

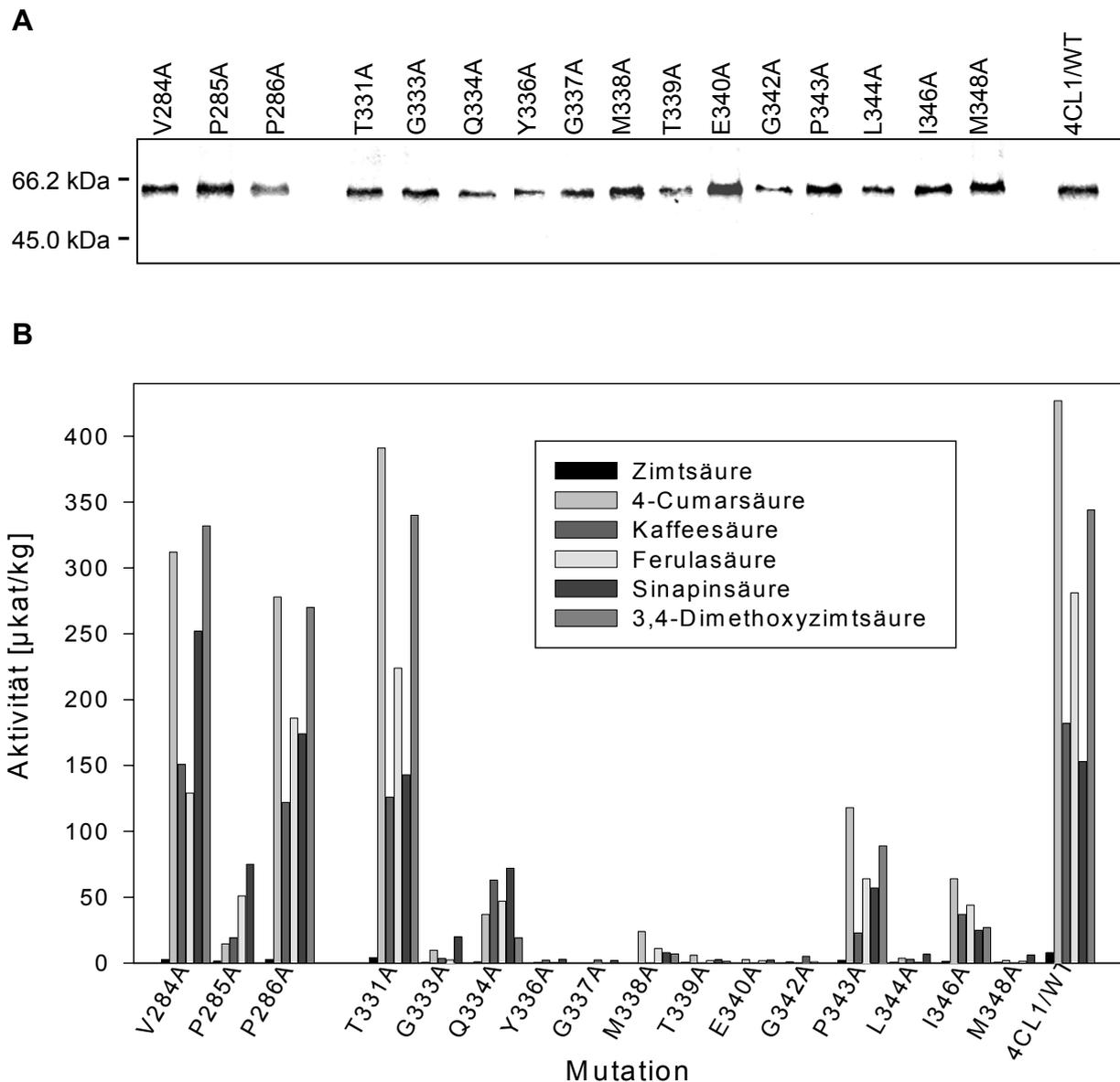


Abb. 24: „Alaninscanning“-Mutagenese der *Gm4CL1*.

A) Jeweils 15 µg bakterieller Rohextrakt der heterolog synthetisierten *Gm4CL1*-Mutanten wurden im 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und immunologisch mit einem gegen Petersilie-4CL gerichteten Antiserum (Ragg et al., 1981) nachgewiesen. Die relativen Molekularmassen von Markerproteinen sind links angegeben.

B) An den angegebenen Positionen der Peptidmotive M4 und M6 wurden die Aminosäuren der Wildtyp-*Gm4CL1* durch Alanin ersetzt. Nach Synthese der *Gm4CL1*-Mutanten und der *Gm4CL1*/WT im *E. coli*-Stamm SG13009 wurde die 4CL-Aktivität in den bakteriellen Rohextrakten bzgl. Zimtsäure (2000 µM), 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure (je 500 µM) im spektralphotometrischen Test bestimmt. Die Aktivitäten der *Gm4CL1*-Mutanten und der Wildtyp-*Gm4CL1* wurden in zwei unabhängigen Expressionsexperimenten bestimmt.

Die Mutanten V284A, P286A und T331A zeigten annähernd gleich hohe Aktivitäten wie *Gm4CL1*, während die Aktivitäten der Mutanten P285A, Q334A, P343A und I346A nur ca. 20% von den Wildtyp-Aktivitäten betragen. Kein oder nur ein sehr geringer Umsatz von Zimtsäurederivaten konnte mit den Mutanten G333A, Y336A, G337A, M338A, T339A, E340A, G342A, L344A und M348A gemessen werden.

Einige der aktiven Mutanten zeigten zudem eine Änderung der Substratspezifität. P285A und Q334A wiesen einen schwächeren Umsatz mit 4-Cumarsäure auf als mit Kaffeesäure, Ferulasäure bzw. Sinapinsäure. Q334A und I346A zeigten eine reduzierte Aktivität gegenüber 3,4-Dimethoxyzimtsäure, während dieses Substrat von der Mutante P285A überhaupt nicht umgesetzt werden konnte. Einen deutlich erhöhten relativen Sinapinsäure-Umsatz (bezogen auf 4-Cumarsäure) wurde bei den Mutanten V284A, P285A, P286A und Q334A im Vergleich zur Wildtyp-*Gm4CL1* beobachtet. Der Aminosäureaustausch an Position 331 schien keinen Einfluß auf das katalytische Verhalten des Enzyms zu haben.

3.2.8 Valin-Deletion im Motiv M6 von *Gm4CL2* und *Gm4CL3*

Wie bereits erwähnt, fehlte der *Gm4CL1* innerhalb des Motivs M6 (GQGYGMTEAGP[V]L) als einziger der bisher bekannten 4CLs ein Valin. Um zu untersuchen, ob das Fehlen mit der Fähigkeit, Sinapinsäure umzusetzen, zusammenhängt bzw. das Vorhandensein dieser Aminosäure die Substratspezifität der *Gm4CLs* beeinträchtigt, wurde dieses Valin durch PCR-Mutagenese in die *Gm4CL1* eingefügt (*Gm4CL1iV344*) und zugleich bei der *Gm4CL2* und *Gm4CL3* deletiert (*Gm4CL2dV345* bzw. *Gm4CL3dV367*). Die Synthese der veränderten Enzyme erfolgte in *E. coli* und wurde immunologisch nachgewiesen (Abb. 25).

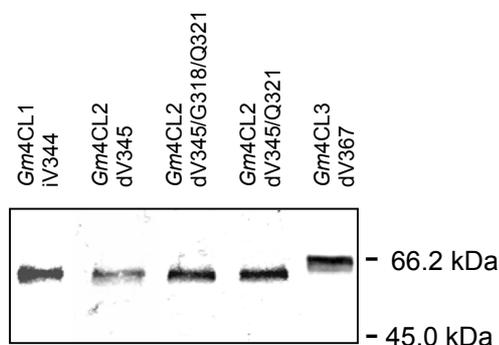


Abb. 25: Immunologischer Nachweis der Produktion der verschiedenen *Gm4CL*-Valinmutanten. Jeweils 15 µg bakterieller Rohextrakt der heterolog synthetisierten *Gm4CL*-Mutanten wurden im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Immunodetektion erfolgte mit einem gegen Petersilie-4CL gerichtetem Antiserum (Ragg et al., 1981). Die relativen Molekularmassen der Standardproteine sind rechts angegeben.

Die Insertion des Valin an Position 344 der *Gm4CL1* hatte eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge. Bei *Gm4CL2dV345* führte die Deletion dieser Aminosäure zu einer veränderten Substratspezifität verglichen mit der Wildtyp-*Gm4CL2* (Tab. 9). Diese Mutante war in der Lage, neben Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure auch Sinapinsäure umzusetzen, während 3,4-Dimethoxyzimtsäure nicht als Substrat akzeptiert wurde. Als K_m -Wert wurde für Sinapinsäure eine Substratkonzentration von 1300 µM bestimmt mit einem

relativen V_{\max} von 44% in Bezug auf V_{\max} von 4-Cumarsäure. Die katalytische Wirksamkeit (rel. V_{\max}/K_m) des Sinapinsäure-Umsatzes betrug $0,03 \mu\text{M}^{-1}$. Die K_m -Werte der *Gm4CL2dV345* für die Substrate Zimtsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure waren ca. 1,5 bis 2-fach höher als bei *Gm4CL2*. Bezüglich 4-Cumarsäure zeigte sich keine Änderung des K_m -Wertes. Hinsichtlich der rel. V_{\max}/K_m -Werte bezüglich Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen *Gm4CL2* und *Gm4CL2dV345* festgestellt werden. Die höchste katalytische Wirksamkeit des mutierten Enzyms lag ebenso wie bei *Gm4CL2* bei den Substraten 4-Cumarsäure ($2,3 \mu\text{M}^{-1}$) und Kaffeesäure ($2,3 \mu\text{M}^{-1}$).

Tab. 9: Vergleich der kinetischen Eigenschaften von *Gm4CL2dV345* und *Gm4CL3dV367* mit den Werten für die jeweiligen Wildtyp-*Gm4CLs*.

Substrat	K_m -Werte		Relatives V_{\max}		Relatives V_{\max}/K_m	
	[μM]		[% der Cumarsäure]		[$1/\mu\text{M}$]	
	4CL2	4CL2dV345	4CL2	4CL2dV345	4CL2	4CL2dV345
Zimtsäure	1700	2900	72	39	0.04	0.01
4-Cumarsäure	42	43	100	100	2.4	2.3
Kaffeesäure	13	24	37	55	2.9	2.3
Ferulasäure	140	240	71	76	0.5	0.3
Sinapinsäure	n.u.	1300	-	44	-	0.03
3,4-DMZ	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	4CL3	4CL3dV367	4CL3	4CL3dV367	4CL3	4CL3dV367
Zimtsäure	980	420	45	28	0.05	0.07
4-Cumarsäure	9	36	100	100	11.1	2.8
Kaffeesäure	50	50	74	63	1.5	1.3
Ferulasäure	3100	70	25	13	0.01	0.2
Sinapinsäure	n.u.	1200	-	10	-	0.01
3,4-DMZ	n.u.	1720	-	94	-	0.05

Die K_m - und V_{\max} -Werte der rekombinanten *Gm4CLs* wurden mittels Lineweaver-Burk-Blots mit mindestens fünf Meßpunkten (*Gm4CL2*, *Gm4CL3*; Möller, 1997) bzw. mit Hilfe der Regressionsgleichung für rechtwinklige Hyperbeln (*Gm4CL2dV345*, *Gm4CL3dV367*) ermittelt. Die relativen V_{\max} -Werte sind in Bezug auf den Wert für 4-Cumarsäure (100%) angegeben. Alle ermittelten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen. 3,4-DMZ: 3,4-Dimethoxyzimtsäure; n.u.: nicht umgesetzt.

Bei *Gm4CL3* führte die Deletion des Valin zu einer noch drastischeren Veränderung der Substratspezifität als bei *Gm4CL2*. Während *Gm4CL3* nur Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure umsetzte, war *Gm4CL3dV367* in der Lage zusätzlich Sinapinsäure ($K_m = 1200 \mu\text{M}$) und 3,4-Dimethoxyzimtsäure ($K_m = 1720 \mu\text{M}$) zu aktivieren (Tab. 9). Gegenüber Ferulasäure zeigte *Gm4CL3dV367* ($K_m = 70 \mu\text{M}$) eine 40-fach höher Affinität als *Gm4CL3* ($K_m = 3100 \mu\text{M}$), während der K_m -Wert für 4-Cumarsäure bei *Gm4CL3dV367* ($36 \mu\text{M}$) viermal höher war als bei *Gm4CL3* ($9 \mu\text{M}$). Die Affinität gegenüber Kaffeesäure wurde durch die Valin-Deletion nicht beeinträchtigt. Bezüglich Zimtsäure sank

der K_m -Wert von 980 μM (*Gm4CL3*) auf 420 μM (*Gm4CL3dV367*). Betrachtet man die katalytische Wirksamkeit (rel. V_{\max}/K_m) fällt auf, daß der 4-Cumarsäureumsatz durch die Valin-Deletion an Effektivität einbüßte (11,1 μM^{-1} bei *Gm4CL3*; 2,8 μM^{-1} bei *Gm4CL3dV367*), während der Ferulasäureumsatz um den Faktor 20 verbessert wurde (0,01 μM^{-1} bei *Gm4CL3*; 0,2 μM^{-1} bei *Gm4CL3dV367*). Die katalytische Wirksamkeit gegenüber Zimtsäure und Kaffeesäure wurde durch die Valin-Deletion nicht beeinträchtigt. Für Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure ergaben sich aufgrund der hohen Michaelis-Menten-Konstanten bzgl. dieser Substrate niedrige rel. V_{\max}/K_m -Werte von 0,01 μM^{-1} (Sinapinsäure) und 0,05 μM^{-1} (3,4-Dimethoxyzimtsäure).

Da die *Gm4CL1* einen ca. 100-fach niedrigeren K_m -Wert für Sinapinsäure besitzt (11 μM) als *4CL2dV345* (1300 μM), wurde durch weitere Mutationen des Enzyms versucht, die Affinität der *Gm4CL2*-Mutante gegenüber Sinapinsäure zu erhöhen. Durch den Vergleich aller bisher verfügbaren 4CL-Aminosäuresequenzen wurde nach weiteren Sequenzbesonderheiten der *Gm4CL1* gesucht, die für eine effektivere Sinapinsäurebindung verantwortlich sein könnten. Als potentielle Kandidaten wurden die Aminosäuren Gly317 und Gln320 der *Gm4CL1* angesehen. Beide Aminosäuren befanden sich zwischen den Motiven M5 und M6 (Abb. 20). Sie waren an dieser Position bei allen anderen 4CL überhaupt nicht (Glycin) oder sehr selten (Glutamin) zu finden. Anstatt der neutralen Aminosäure Glycin besitzen die anderen 4CLs entweder ein polares Serin (*Le4CL1*) oder die positiv geladenen Aminosäuren Arginin (*Le4CL2*) oder Lysin (alle anderen 4CLs). Das Gln320 der *Gm4CL1* war nur bei drei weiteren 4CLs (*Lp4CL2*, *At4CL3* und *Lp4CL3*) an der im Alignment entsprechenden Stelle vorhanden. Alle anderen 4CLs besaßen dort ein negativ geladenes Glutamat.

Tab.10: Kinetische Eigenschaften der *Gm4CL2*-Mutanten bzgl. Sinapinsäure.

	K_m [μM]	rel. V_{\max} [% von 4-Cumarsäure]	rel. V_{\max}/K_m [1/ μM]
<i>Gm4CL2dV345</i>	1300	44	0,03
<i>Gm4CL2dV345Q321</i>	680	21	0,03
<i>Gm4CL2dV345G318Q321</i>	710	23	0,03

Die rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* synthetisiert und ihre kinetischen Daten bzgl. Sinapinsäure bestimmt. K_m - und V_{\max} -Werte wurden mit Hilfe der Regressionsgleichung für rechtwinklige Hyperbeln ermittelt. Die Aktivitätsmessungen wurde mit bakteriellem Rohextrakt durchgeführt.

Bei *Gm4CL2dV345* wurde einerseits Glu321 gegen ein Glutamin ausgetauscht (*Gm4CL2dV345Q321*) und andererseits durch eine Doppelmutation Lys318 gegen ein Glycin und Glu321 gegen ein Glutamin ersetzt (*Gm4CL2dV345G318Q321*). Nach Synthese in *E. coli* konnten beide mutierten Proteine immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 25). Im spektralphotometrischen Test wurde jeweils ihre Affinität gegenüber Sinapinsäure bestimmt (Tab. 10). Für *Gm4CL2dV345Q321* wurde ein K_m -Wert von 680 μM und ein rel. V_{\max} von 21% ermittelt. *Gm4CL2dV345G318Q321* zeigte eine halbmaximale Substratsättigung bei

einer Sinapinsäurekonzentration von 710 μM und ein rel. V_{max} von 23%. Im Vergleich zur *Gm4CL2dV345* ($K_{\text{m}} = 1300 \mu\text{M}$) bedeutete dies jeweils eine zweifach höhere Affinität gegenüber Sinapinsäure. Die katalytische Wirksamkeit (rel. $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$) hatte sich in beiden Fällen im Vergleich zu *Gm4CL2dV345* nicht verändert ($0,03 \mu\text{M}^{-1}$). Die hohe Affinität, wie sie *Gm4CL1* bezüglich dieses Substrates zeigte ($K_{\text{m}} = 11 \mu\text{M}$), konnte durch diese Veränderungen nicht erreicht werden. Sowohl *Gm4CL2dV345G318Q321* als auch *Gm4CL2dV345Q321* waren außerdem nicht in der Lage, 3,4-Dimethoxyzimtsäure umzusetzen.

4 Diskussion

Knobloch und Hahlbrock (1975) hatten aus nicht-elicitierten Sojabohnenzellkulturen zwei Isoenzyme der 4-Cumarat:Coenzym A Ligase partiell gereinigt, die sich in ihren Substratspezifitäten unterschieden und als Ligase 1 und 2 bezeichnet wurden. Zur molekularen Charakterisierung der beiden *Gm4CL*-Isoformen wurde versucht, ihre kodierenden Sequenzen aus elicitierten Sojabohnenzellkulturen zu isolieren, wobei allerdings nur die cDNA der Ligase 2 kloniert werden konnte (Uhlmann und Ebel, 1993; Möllers, 1997). Ferner wurden mit *Gm4CL13* und *Gm4CL16* cDNA-Fragmente von zwei weiteren Sojabohne-4CL-Isoformen (*Gm4CL3* und *Gm4CL4*) isoliert, von denen jedoch nur die Sequenz der *Gm4CL13* vervollständigt wurde (Uhlmann und Ebel, 1993; Möllers, 1997). Die Isolierung der cDNA der Ligase 1 sollte über die klassische Methode durch Proteinreinigung und cDNA-Bank-Sichtung erfolgen. Dazu wurde Ligase 1 erneut aus nicht-elicitierten Sojabohnenzellkulturen angereichert und durch Mikrosequenzierung wurden drei Peptide erhalten, die zur Herstellung einer *Gm4CL1*-Sonde verwendet wurden.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die 4CL-Genfamilie der Sojabohne mit großer Wahrscheinlichkeit zu vervollständigen und molekular, biochemisch, und physiologisch zu erfassen. Ferner konnten mögliche Sequenzmotive identifiziert werden, die im Zusammenhang mit der Bindung der Zimtsäurederivate der 4CL stehen.

4.1 Die Genfamilie der 4-Cumarat:Coenzym A Ligase aus Sojabohne

Die nun aus vier Mitgliedern bestehende Familie (*Gm4CL1* bis 4) wurde durch die Isolierung einer cDNA für die bereits beschriebene Ligase 1 (Knobloch und Hahlbrock, 1975), sowie durch die Vervollständigung eines partiellen Klons (Uhlmann und Ebel, 1993) komplettiert. Die angenommene Anzahl von vier 4CL-Isoformen konnte durch die Herstellung genomischer Southern-Blots bestätigt werden (Abb. 12). Auch das Durchmusterung von Sequenz-Datenbanken, die nach der systematischen Sequenzierung aller exprimierten Gene spezifischer Gewebe (Wurzeln, Stengel und Blätter unbehandelter Sojabohne Pflanzen) zur Verfügung gestellt werden, identifizierte keine weiteren, bisher unbekannt 4CL-Sequenzen (http://genome.wustl.edu/est/soybean_esthmpg.html; Stand: März 2002). Insgesamt wurden bisher 16 *expressed sequence tags* (ESTs) abgelegt, von denen zehn Sequenzen der *Gm4CL2* und drei Sequenzen der *Gm4CL1* eindeutig zugeordnet werden konnten. Bei den drei übrigen Fragmenten handelt es sich vermutlich um sogenannte „4CL-ähnliche“ Sequenzen, da sie nur 37 bis 53% Identität mit den cDNAs der Sojabohne-4CLs aufwiesen. 4CL-ähnliche Sequenzen wurden beispielsweise auch in *Arabidopsis* gefunden, wo sie Identitäten zwischen

38 und 44% mit den *At4CL*-Sequenzen zeigten (Ehltling et al., 1999; Cukovic et al., 2001). Über die Funktion dieser Sequenzen ist bisher nichts bekannt.

Das Vorkommen weiterer 4CL-Isoformen in Sojabohne kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Einerseits deuten sowohl die Aktivitätsmessungen als auch die Western-Blot-Analysen auf die Anwesenheit von 4CL in jungen Blättern und Sproßspitzen hin, andererseits konnten aber in diesen Organen in den Northern-Blot-Analysen keine Transkripte der vier bekannten Sojabohne-4CLs nachgewiesen werden. Allerdings wäre auch denkbar, daß die gewählten Hybridisierungsbedingungen die Ursache dafür waren, daß in diesen Organen keine 4CL-Transkripte hybridisierten, da zumindest in Sproßspitzen mittels RT-PCR *Gm4CL1*-Transkripte indirekt nachgewiesen werden konnten.

Unter der Annahme der Existenz einer bisher nicht identifizierten 4CL-Isoform in Sojabohne müßte diese sich strukturell von den bisher bekannten Isoformen stark unterscheiden. Ferner müßte diese Isoform eine ähnliche Substratspezifität aufweisen wie *Gm4CL1*, da Sproßspitzen- und Blattextrakte hohe Aktivitäten mit 3,4-DMZ und Ferulasäure aufwiesen.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die errechneten Aktivitäten der einzelnen *Gm4CL*-Isoformen in den verschiedenen Pflanzenorganen, so zeigen sich auch hier Unstimmigkeiten zu den Ergebnissen der Northern-Analysen. Den Aktivitätsmessungen zufolge dominierte in den Pflanzenorganen deutlich die Aktivität der *Gm4CL1* gegenüber der Aktivität der *Gm4CL2* (Tab. 6), obwohl die Transkriptmenge beider Isoformen in den verschiedenen Organen annähernd gleich war (Abb. 13). Zwar war die spezifische Radioaktivität der verwendeten Sonden nicht exakt gleich, doch sollte zumindest annähernd eine Korrelation zwischen Transkriptmenge und Aktivität der einzelnen Isoformen zu erkennen sein, wie es beispielsweise bei der Elicitierung der Zellkulturen zu beobachten war (Abb. 14 und 15). Zumindest im Hypokotylextrakt sollte *Gm4CL2*-Aktivität erwartet werden, da hier die größte Menge an *Gm4CL2*-Transkripten nachgewiesen werden konnte. Auch diese Diskrepanzen könnten durch die Existenz einer weiteren 4CL-Isoform in Sojabohne erklärt werden. Es wäre allerdings auch denkbar, daß bisher nicht bekannte Faktoren in den Pflanzenextrakten die Substratspezifität der *Gm4CLs* verändern. Die Zugabe von Tabakstengel-Extrakten zu bakteriellem Rohextrakt mit rekombinanter Tabak-4CL führte beispielsweise zur Veränderung der Substratspezifität der Tabak-4CL (Lee und Douglas, 1996). Zur Erklärung dieses Phänomens wurden zwei mögliche Mechanismen postuliert. Einerseits könnte die 4CL in Tabak posttranslational modifiziert werden. Es gibt Hinweise, daß die Phenylalanin-Ammonium-Lyase, ebenso ein Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels, durch Phosphorylierung reguliert wird (Cheng et al., 2001). Andererseits könnte die 4CL einen Multienzymkomplex mit anderen Proteinen bilden, wie es für einige Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels postuliert wurde (Hrazdina und Wagner, 1985; Desphande et al., 1993). Als weitere Möglichkeit zur Erklärung dieser Ergebnisse könnte eine unterschiedliche Stabilität der mRNA oder der Proteine der *Gm4CLs* in den verschiedenen Pflanzenorganen gesehen werden.

4.2 Verwandtschaftsverhältnisse der 4CL

Die phylogenetische Rekonstruktion von 4CL-Aminosäuresequenzen zeigte Verwandtschaftsverhältnisse sowohl innerhalb der Sojabohne-4CL-Genfamilie als auch innerhalb der Angiospermen auf. Eine entwicklungsgeschichtlich frühe Genduplikation scheint zur Aufspaltung der 4CL-Isoformen in zwei Klassen geführt zu haben (Ehling et al. 1999, Abb. 9). Sojabohne, *Arabidopsis*, Espe (*Populus tremuloides*), Himbeere (*Rubus idaeus*) und Steinsame (*Lithospermum erythrorhiza*) besitzen Isoformen in beiden Klassen. Durch sich anschließende, unabhängige Genduplikationen innerhalb der Klasse I bzw. II kann es zur Bildung von weiteren 4CL-Isoformen gekommen sein. Je nach dem Zeitpunkt der nachfolgenden Duplikationsereignisse, die innerhalb einer Pflanzenspezies stattgefunden haben können, konnten sich hier bereits Isoformen mit deutlichen strukturellen Unterschieden entwickeln. In Sojabohne und Himbeere liegen jeweils drei Klassen strukturell sehr unterschiedlicher Isoformen vor, die jeweils untereinander nur geringe Sequenzidentitäten von 60-75% aufweisen. Zumindest im Falle der Sojabohne-Isoformen spiegeln sich diese strukturellen Unterschiede auch in den unterschiedlichen Substratspezifitäten der Isoformen wider. Die 4CL-Enzyme aus Himbeere sind bisher noch nicht biochemisch charakterisiert worden. Relativ spät erfolgte die Genduplikation in Sojabohne, die zur Bildung von *Gm4CL3* und *Gm4CL4* führte, weshalb beide Isoformen nahezu identische katalytische Eigenschaften besitzen. Die Diversität der 4CLs zeigte sich auch innerhalb der Leguminosen, da die genspezifischen Sonden der *Gm4CLs* bei verschiedenen Leguminosen-Spezies hybridisieren. Aufgrund der unvollständigen oder fehlenden Daten bzgl. der katalytischen Eigenschaften vieler der für die phylogenetische Analyse verwendeten 4CL-Sequenzen ist es schwierig, Gemeinsamkeiten zwischen den Isoformen der jeweiligen Klassen zu finden. Es wurde postuliert, daß in den Klassen I und II 4CL-Isoformen mit ähnlichen physiologischen Funktionen zusammengefaßt sind (Ehling et al., 1999). Demnach sollten die Isoformen der Klasse I hauptsächlich an der Synthese von Ligninvorstufen und einfachen Phenylpropanverbindungen beteiligt sein, während die Vertreter der Klasse II vornehmlich Vorstufen für den (Iso-)Flavonoid-Metabolismus bereitstellen. Allerdings scheinen die Gemeinsamkeiten der 4CL-Isoformen innerhalb der beiden Klassen nicht bei ähnlichen physiologischen Funktionen, sondern bei ähnlichen katalytischen Eigenschaften der 4CL-Isoformen zu liegen. Betrachtet man die ermittelten katalytische Wirksamkeiten (rel. V_{\max}/K_m) von *Gm4CL3*, *Gm4CL4* und *At4CL3* aus Klasse II, so fällt auf, daß diese Isoformen 4-Cumarsäure am effektivsten umsetzen. Ferner ist zu erkennen, daß alle bisher klonierten 4CLs der Poaceen (Lolch (*Lolium perenne*), Reis (*Oryza sativa*)) ausschließlich in Klasse II zu finden sind. Poaceen benötigen sowohl zur Synthese von Flavonoiden als auch von Lignin hauptsächlich 4-Cumaroyl-Einheiten, weshalb deren 4CL-Isoformen vermutlich 4-Cumarsäure als bevorzugtes Substrat aktivieren. Das könnte einerseits bedeuten, daß in Klasse II Isoformen zusammengefaßt sind, die 4-Cumarsäure den anderen Zimtsäurederivaten

als Substrat vorziehen. Andererseits scheint die Einteilung der 4CL-Isoformen in die Klassen I und II nicht darauf hinzudeuten, daß gemeinsam klassifizierte Isoformen ähnliche physiologische Funktionen erfüllen, da mit den Isoformen der Poaceen in Klasse II auch 4CLs vertreten sind, die wahrscheinlich an der Ligninsynthese beteiligt sind. In Klasse I scheinen Isoformen zusammengefaßt zu sein, die ein erweitertes Substratspektrum zeigen oder zumindest nicht auf 4-Cumarsäure-Umsatz spezialisiert sind. Die kinetischen Daten der bisher biochemisch charakterisierten 4CLs aus Klasse I unterstützen diese Art der Einteilung. *Gm4CL1*, *Gm4CL2*, *At4CL1* und *Poph4CL2* besitzen jeweils ein relativ breites Substratspektrum und *At4CL2* setzt bevorzugt Kaffeesäure um.

4.3 Regulatorische Funktion der 4CL

Der 4CL wurde aufgrund seiner zentralen Position im allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel eine wichtige regulatorische Funktion hinsichtlich der Bereitstellung unterschiedlich substituierter Zimtsäure-CoA-Ester für die Synthese spezifischer Phenylpropanoide zugesprochen. Mit Hilfe der standardisierten Expression der 4CL-cDNAs aus Sojabohne in *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, daß die *Gm4CL*-Isoformen eine sehr unterschiedliche Substratspezifität besitzen (Tab. 7). *Gm4CL1* aktivierte alle angebotenen Substrate einschließlich Sinapat, während *Gm4CL3* und *Gm4CL4* eine hohe Selektivität aufwiesen. Die *Gm4CL2* nahm eine Mittelstellung zwischen *Gm4CL1* und *Gm4CL3/4* ein. Außerdem konnte beobachtet werden, daß *Gm4CL1* vor allem zu hoch substituierten Zimtsäurederivaten (Ferulasäure und Sinapinsäure) eine hohe Affinität aufwies. *Gm4CL3* und *Gm4CL4* hingegen waren auf den Umsatz der gering substituierten 4-Cumarsäure spezialisiert. Auch hier nahm *Gm4CL2* mit einer hohen Affinität gegenüber 4-Cumarsäure und Kaffeesäure eine Mittelstellung ein. Zimtsäure wurde von keiner der Sojabohne-Isoformen effektiv umgesetzt.

Durch die Herstellung spezifischer cDNA-Sonden konnte die Expression von *Gm4CL1*, *Gm4CL2* und *Gm4CL3/4* in verschiedenen Pflanzenorganen, in Elicitor-behandelten Zellkulturen und in Zoosporen-infizierten Keimlingen untersucht werden. Ferner war es möglich, aufgrund der unterschiedlichen Substratspektren von *Gm4CL1*, *Gm4CL2* und *Gm4CL3/4*, deren Aktivitäten in elicitierten Zellkulturen zu bestimmen. Da sowohl die kodierenden Sequenzen der Isoformen 3 und 4 als auch ihre Substratspektren sehr ähnlich sind, konnte allerdings weder bei Northern-Analysen noch bei 4CL-Aktivitätsmessungen zwischen diesen beiden Isoformen unterschieden werden.

Durch die gegensätzliche Regulation der *Gm4CL1* und *Gm4CL3/4* kann es im Verlauf der Elicitierung zu einer Verschiebung des zur Verfügung gestellten Spektrums der Zimtsäure-CoA-Ester kommen, das einerseits vom breiten Substratspektrum der *Gm4CL1* und andererseits vom eingeschränkten Spektrum der *Gm4CL3/4* bestimmt würde. Auf diese

Weise könnte die 4CL in Sojabohne den Metabolitfluß im Phenylpropanstoffwechsel zu den jeweils benötigten Endprodukten leiten und dadurch die Umstellung des Stoffwechsels nach Elicitorbehandlung regulieren. Eine ähnliche Situation scheint in Sojabohnekeimlingen nach Infektion mit Zoosporen vorzuherrschen. Auch hier wurden *Gm4CL3/4* durch die Behandlung induziert. Allerdings konnte keine Aussage über das Verhalten der *Gm4CL1*-Transkripte getroffen werden, da die mRNA dieser Isoform in Keimwurzeln nur sehr schwach exprimiert wurde und somit eine mögliche Reduktion der Expression nicht verfolgt werden konnte. Um dies zu untersuchen, müßten die Infektionen an Stengelbereichen der Sojabohnepflanzen durchgeführt werden, die sich allerdings aufgrund der Behaarung schlecht mit Zoosporen infizieren lassen.

Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifitäten der Sojabohne-4CLs, ihrer organspezifischen Expression und ihrer differentiellen Expression nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen bzw. nach der Infektion von Sojabohnekeimlingen scheint folglich die 4CL in Sojabohne eine wichtige Kontrollfunktion bei der Verteilung der Zimtsäurederivate zur Synthese spezifischer Phenylpropanoide zu besitzen. 4CL-Isoformen, die wie die Sojabohne-4CLs eine große Breite der unterschiedlich substituierten Zimtsäurederivate umsetzen können, sind bisher nur aus Erbse (*Pisum sativum*), Pappel (*Populus x euamericana*) und Petunie (*Petunia hybrida*) partiell gereinigt worden (Ranjeva et al., 1976; Wallis und Rhodes, 1977; Grand et al., 1983). Aus Pappel wurden drei 4CL-Isoformen angereichert (I-III), die unterschiedliche Substratspezifitäten besaßen. Alle drei Isoformen aktivierten 4-Cumarsäure und Ferulasäure. Die Isoform I war zudem in der Lage, 5-Hydroxyferulasäure und Sinapinsäure umzusetzen, während die Form III zusätzlich Kaffeesäure aktivierte. Außerdem konnte gezeigt werden, daß im Sklerenchym ausschließlich die Form I und im Xylem alle drei Formen exprimiert wurden. Da im Sklerenchym und Xylem der Pappel hinsichtlich des Syringylgehaltes verschiedene Lignintypen vorliegen, wurde eine Korrelation zwischen den dort vorhandenen 4CL-Isoformen und den Lignintypen vermutet (Grand et al., 1983), so daß auch in Pappel die Bereitstellung unterschiedlich substituiertes Zimtsäurederivate zur Synthese spezifischer Phenylpropanoide von 4CL reguliert sein könnte. Ob auch die 4CL-Isogene aus Erbse und Petunie differentiell exprimiert werden, wurde bisher nicht analysiert.

In vielen anderen Pflanzen, in denen 4CL bisher untersucht wurde, scheint die regulatorische Funktion dieses Enzym hinsichtlich der Verteilung unterschiedlich aktivierter Zimtsäurederivate hingegen nicht so ausgeprägt zu sein wie z. B. in Sojabohne. In Hybridpappel (*Populus hybrida*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Petersilie (*Petroselinum crispum*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) existieren z. B. nahezu identische 4CL-Isoformen (Douglas et al., 1987; Lozoya et al., 1988; Becker-André et al., 1991; Lee und Douglas, 1996; Allina et al., 1998), wodurch eine Regulation auf Ebene der 4CL nur bedingt möglich scheint. In *Arabidopsis* und Espe (*Populus tremuloides*) wurden 4CL-Isoformen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten beschrieben, doch war keine dieser Isoformen in der Lage, Sinapinsäure

zu aktivieren (Hu et al., 1998; Ehling et al., 1999). Dies gilt auch für die 4CLs aus Hybridpappel, Kartoffel, Petersilie und Tabak. Aufgrund ihrer katalytischen Fähigkeiten stellen die 4CLs dieser Pflanzen hauptsächlich 4-Cumaroyl-CoA, Kaffeoyl-CoA und teilweise Feruloyl-CoA für die Synthese der verschiedenen Phenylpropanoide zur Verfügung. Weitere benötigte Substitutionen (3'-*O*-Methylierung, 5'-Hydroxylierung und 5'-*O*-Methylierung) scheinen erst nach der Aktivierung der Zimtsäuren durch die Aktivität von Hydroxylasen und *O*-Methyltransferasen eingeführt zu werden (Kneusel et al., 1989; Humphreys et al., 1999; Osakabe et al., 1999; Guo et al., 2001; Parvathi et al., 2001; Ye et al., 2001). Neuere Erkenntnisse hinsichtlich der Ligninbiosynthese scheinen diese Hypothese zu bekräftigen (Kapitel 1.3). Aber auch bei der Synthese von löslichen Phenylpropanoiden können nach der Substrataktivierung Substitutionen am Phenylringsystem auftreten. Aus *Arabidopsis* wurde eine cDNA kloniert, die für eine Cytochrom P450-abhängige 3'-Hydroxylase kodiert (Schoch et al., 2001). Das in Hefe hergestellte rekombinante Enzym konnte weder 4-Cumarsäure noch 4-Cumaroyl-Glucose, 4-Cumaroyl-CoA, 4-Cumaraldehyd oder 4-Cumaryl-Alkohol umsetzen, während die 5-*O*-D-Shikimisäure- und Chinasäure-Ester von 4-Cumarsäure in die entsprechenden Kaffeesäureverbindungen umgewandelt werden konnten. Es wurde vermutet, daß dieses Enzym sowohl die Synthese von Chlorogensäure als auch die 3-Hydroxylierung von Ligninmonomeren katalysiert (Schoch et al., 2001).

4.4 Mögliche physiologische Funktionen der 4CL-Isoformen in Sojabohne

Aufgrund der bereits diskutierten Unterschiede der 4CL-Isoformen der Sojabohne bezüglich der Substratspezifitäten, der organspezifischen Bildung und der differentiellen Synthese nach Elicitierung von Zellkulturen bzw. Infektion von Keimlingen, können ihnen unterschiedliche physiologische Funktionen zugeschrieben werden (Abb. 26). Die bevorzugten Substrate der *Gm4CL1* sind 4-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure (Tab. 7). Vor allem aufgrund der Fähigkeit, die beiden letztgenannten Substrate effektiv umzusetzen, wurde der *Gm4CL1* bereits früher eine Beteiligung an der Ligninbiosynthese zugesprochen (Knobloch und Hahlbrock, 1975). Dies wurde durch die verstärkte Bildung der *Gm4CL1* in älteren, verholzenden Stengelbereichen bestätigt (Abb. 13, Tab. 6). Ferner konnte Farmer (1985) eine Abnahme der Lignifizierung in Elicitor-behandelten Sojabohnenzellkulturen messen. Im Zusammenhang mit der Reduktion der *Gm4CL1*-Aktivität, die ebenfalls nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen beobachtet wurde (Abb. 14), ist dies ein weiterer indirekter Hinweis auf eine Beteiligung der *Gm4CL1* bei der Ligninbiosynthese.

In Sojabohne scheint die Synthese der Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten über die Aktivierung der entsprechenden Zimtsäurederivate zu verlaufen. Diese Vermutung wurde durch die kinetischen Daten der aus Sojabohnenzellkulturen partiell gereinigten Cinnamoyl-CoA-Reduktase und Cinnamylalkoholdehydrogenase bekräftigt, die die Reduktion der aktivierten

(Lee et al., 1997). Es wurde daher vermutet, daß die Syringyl-Einheiten in *Arabidopsis* auf einem 4CL-unabhängigen Weg synthetisiert werden (Lee et al., 1997).

In einigen Pflanzen ist die Hydroxylierung von Zimtsäurederivaten auf Ebene ihrer Glucose-, Shikimisäure- oder Chinasäure-Ester beschrieben worden (Strack und Bokern, 1984; Kühnl et al., 1987; Kneusel et al., 1989; Tanaka und Kojima, 1991). Ein Enzym, daß 4-Cumaroyl-Glucose in Kaffeoyl-Glucose umwandelt, wurde in Süßkartoffel beschrieben, wodurch die Hydroxylierung von 4-Cumarsäure umgangen werden könnte (Tanaka und Kojima, 1991). Inwiefern solche Modifikationen auch auf Ebene der Zimtsäurealkohol-4-*O*-Glucoside, der Transportform der Monolignole, stattfinden, ist bisher noch nicht bekannt. Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von Syringyl-Einheiten wurde in Espe vermutet. Hier wurde eine 4CL-Isoform (*Popt4CL1*) beschrieben, die spezifisch im verholzenden Xylem exprimiert wurde (Hu et al., 1998). Diese Isoform war inaktiv gegenüber Sinapinsäure, aber sie war in der Lage, 5-Hydroxyferulasäure zu aktivieren, die ebenfalls als mögliche Vorstufe von Syringyl-Einheiten betrachtet wird (Higuchi, 1985). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß innerhalb der Pflanzen die Art der Monolignol-Synthese - vor allem die Synthese der Syringyl-Einheiten - sehr variabel sein kann.

Da *Gm4CL2* die hoch substituierten Zimtsäurederivate nur schwach (Ferulasäure) bzw. überhaupt nicht (Sinapinsäure) umsetzen kann, sondern bevorzugt 4-Cumarsäure und Kaffeensäure aktiviert, wird ihr eine Beteiligung an der (Iso-)Flavonoidbiosynthese zugesprochen (Knobloch und Hahlbrock, 1975). Allerdings ist auch denkbar, daß diese Isoform für die Synthese von Suberin oder Zellwand-gebundener und löslicher Phenylpropanoide wie z. B. Hydroxyzimtsäure-Ester oder Chlorogensäure verantwortlich ist, die für das Pflanzenwachstum und die Pflanzenentwicklung notwendig sind. Eine Beteiligung der *Gm4CL1* an der Produktion derartiger Substanzen kann aufgrund ihres effektiven 4-Cumarsäure-Umsatz ebenso nicht ausgeschlossen werden.

In unbehandelten Sojabohnenzellkulturen der Wachstumsstadien I und II konnte weder *Gm4CL3/4*-Aktivität gemessen noch deren Transkripte nachgewiesen werden. Nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen bzw. Infektion von Sojabohnekeimwurzeln mit Zoosporen von *P. sojae* konnte eine Aktivitätssteigerung von *Gm4CL3/4* beobachtet werden, die auf die induzierte Expression der beiden *Gm4CL*-Isoformen 3 und 4 zurückzuführen war (Abb. 15 und 16). Ob die beiden Isoformen unterschiedlich stark synthetisiert werden, konnte nicht bestimmt werden. Sowohl die Tatsache, daß die Bildung der beide Isoformen nach Elicitorbehandlung bzw. Infektion induziert wird, als auch deren sehr effektiver 4-Cumarsäure-Umsatz, deuten auf eine Beteiligung von *Gm4CL3* und 4 an der Pathogenabwehr hin. Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, wird Cumaroyl-CoA für die Synthese von (Iso-)Flavonoiden benötigt, zu denen auch die Glyceolline der Sojabohne zählen. Der zeitliche Verlauf der Induktion von *Gm4CL3/4* korrelierte mit dem anderer, an der

Glyceollinbiosynthese beteiligter Enzyme. Ebenso wie *Gm4CL3/4* wurden z. B. auch die Gene weiterer Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (PAL, C4H) und die Gene der ersten Enzyme der Flavonoidbiosynthese (Chalkonsynthase, Chalkonisomerase, Chalkonreduktase) nach Elicitierung von Sojabohnenzellkulturen induziert (Hille et al., 1982; Schopfer, 1998; Welle et al. 1991). Nach ca. 4 h Induktion wurde für diese Gene die maximale Transkriptmenge nachgewiesen, während das Transkriptmaximum später Glyceollinbiosynthesegene (Isoflavonreduktase, 2'-Hydroxydihydrodaidzein-reduktase, 3,9-Dihydroxypterocarpan-6a-Hydroxylase) bei ca. 9 h liegt (Schopfer, 1998; Schopfer et al., 1998).

4.5 Die Substratspezifität der 4CL wird durch den zentralen Sequenzbereich bestimmt

Durch den Austausch von Domänen zwischen *Gm4CL1* und *Gm4CL3* konnte der Bereich der 4CL-Sequenz, der von den Boxen I und II begrenzt wird, als Substratspezifität-determinierende Region (SdR) identifiziert werden. Wurde dieser Bereich der *Gm4CL1* durch den entsprechenden Bereich der *Gm4CL3* ersetzt, so zeigte die Hybridform die Substratspezifität der *Gm4CL3* (H4, Tab. 8). In dieser Region waren auch in der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramicidin-S-Synthetase (PheA) die Aminosäuren lokalisiert, die für die Bindung des Substrates Phenylalanin verantwortlich waren (Conti et al., 1997). Obwohl sich die Adenylat-bildenden Enzyme hinsichtlich ihrer zu aktivierenden Substrate stark unterscheiden, scheinen ihre Substratbindetaschen dennoch aus homologen Bereichen der Primärsequenz gebildet zu werden.

Wurde allerdings der zentrale Sequenzbereich der *Gm4CL3* durch den entsprechenden Bereich der *Gm4CL1* ersetzt, zeigte das Hybridprotein keine Aktivität (H8, Tab. 8). Eventuell führte hier der längere N-Terminus der *Gm4CL3* zu Konformationsänderungen im Bereich der Substratbindetasche, wodurch die Substratbindung und/oder der Substratumsatz nicht mehr möglich war. Für diese Vermutung spricht außerdem, daß das Ersetzen des N-Terminus der *Gm4CL1* durch den N-Terminus der *Gm4CL3* ebenso zu einer inaktiven Hybridform führte (H7), während im umgekehrten Fall (H3) das Hybridprotein aktiv war. Ferner war ein verkürztes *Gm4CL1*-Protein, dem 18 aminoterminal Aminosäuren fehlten (Expression der aus der cDNA-Bank isolierten unvollständigen *Gm4CL1*, Kapitel 3.1.4), nicht aktiv. Sowohl bei PheA als auch bei Luciferase liegt der N-Terminus in unmittelbarer Umgebung der Substratbindetasche (Conti et al., 1997). Er ist aber nicht direkt an der Substratbindung oder Katalysereaktion beteiligt, sondern scheint eher für die Proteinstabilisierung von Bedeutung zu sein.

Der hochkonservierte Carboxyterminus konnte zwischen *Gm4CL1* und *Gm4CL3* ausgetauscht werden, ohne daß die Substratspezifität beeinträchtigt wurde (H1, H5). Diese

Region ist innerhalb der Adenylat-bildenden Enzyme der am höchsten konservierte Bereich und bildete sowohl bei PheA und Luciferase (Conti et al., 1997) als auch im Strukturmodell der *Gm4CL1* eine strukturell eigenständige Domäne. In dieser Domäne befanden sich in PheA drei Aminosäuren (Asp413, Tyr425, Lys517), für die die Beteiligung an der Adenylat-Bindung gezeigt wurde. Das Lysin interagiert außerdem mit der α -Carboxylgruppe des gebundenen Phenylalanin (Conti et al., 1997). Zwei der beschriebenen Aminosäuren (Asp, Lys) liegen bei den 4CLs an konservierten Positionen. Als guter Hinweis auf eine vergleichbare Funktion dieser Reste bei den 4CLs kann die postulierte Substrat-stabilisierende Wirkung des entsprechenden Lysinrestes der 4CL2 aus *Arabidopsis* gewertet werden (Stuible et al., 2000).

Wenn sich die SdR aus Teilen der *Gm4CL1* und *Gm4CL3* zusammensetzte (H2, H6, H9), waren die resultierenden Hybridproteine nicht aktiv. Dies könnte auf der vergleichsweise geringen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen (58%) beruhen, die jeweils unterschiedliche Feinstrukturen der Substratbindetaschen zur Folge haben könnten. Entsprechende 4CL-Hybridproteine der *Arabidopsis*-Isoformen 4CL1 und 4CL2 waren, wahrscheinlich aufgrund der größeren Übereinstimmungen sowohl der Größe als auch der Sequenz (86% Identität), aktiv (Ehltling et al., 2001). Es konnten zwei Bereiche innerhalb der *At4CL*-Sequenzen als Substratbindedomänen identifiziert werden (sbd I und sbd II). Diese benachbarten Regionen befanden sich im zentralen Bereich der 4CL-Sequenzen, der auch bei den Sojabohne-Isoformen die Substratspezifität bestimmte. Beide Domänen der *At4CL1* ermöglichten unabhängig voneinander in *At4CL2* den Umsatz von Ferulasäure, die vom Wildtyp-Enzym nicht aktiviert wurde. Im Gegensatz dazu waren beide Domänen der *At4CL2* nötig, um in *At4CL1* den *per se* vorhandenen Ferulasäure-Umsatz zu unterdrücken (Ehltling et al., 2001).

4.6 Die Motive M4 und M6 sind mögliche Substratbindemotive

Das Motiv 284VPP286 der *Gm4CL1* ist bei allen bisher bekannten 4CLs konserviert und befindet sich im Strukturmodell der *Gm4CL1* am Rand der Substratbindetasche (Abb. 23, Motiv M4). Bei den Mutanten V284A und P286A zeigte sich ein erhöhter relativer Umsatz der höher substituierten Zimtsäurederivate Sinapinsäure und 3,4-DMZ in Bezug zum 4-Cumarsäure-Umsatz. Dies könnte auf einer Größenveränderung der Substratbindetasche beruhen. Die Seitenkette des Alanin ist kleiner als die des Valin und des Prolin, wodurch eine effektivere Bindung der höher substituierten Zimtsäuren ermöglicht werden könnte. Ferner könnten Strukturveränderungen durch den Einfluß des Alanin auf die Sekundärstruktur verursacht worden sein. Alanin ist ein starker α -Helix-Bildner, während Valin ein starker β -Faltblatt-Bildner und Prolin ein starker α -Helix-Brecher ist. In PheA wurde direkt am Motiv LPP ein Übergang der Sekundärstruktur von einem β -Faltblatt in eine α -Helix beobachtet

(Conti et al., 1997). Sollte dies ebenso bei *Gm4CL1* der Fall sein, wäre ein Einfluß des Alanin auf die Sekundärstruktur, der letztendlich auch die Tertiärstruktur des Proteins verändert, in dieser Region durchaus denkbar.

Bei einer großen Anzahl anderer Adenylat-bildender Enzyme ist zumindest das Pro285 des VPP-Motiv hoch konserviert. Bei PheA ist dieses Motiv (279LPP281) Bestandteil der Substratbindetasche und vermutlich für die optimale Positionierung des Thr278 verantwortlich. Diese Aminosäure bildet zusammen mit Ala236, Trp239, Ala301, Ala322, Ile330 und Cys331 eine Spalte, in der der aromatische Rest des Phenylalanin untergebracht ist. Das Thr278 wurde dabei in der Nähe der *para*-Position des Phenylrings lokalisiert (Conti et al., 1997).

Wurde dieses Prolin bei *Gm4CL1* durch ein Alanin ersetzt, so zeigte sich vor allem gegenüber gering substituierten Zimtsäurederivate ein starker Aktivitätsverlust, außerdem konnte das synthetische Substrat 3,4-DMZ nicht mehr umgesetzt werden (Abb. 24). 3,4-DMZ stellte das einzige der getesteten Zimtsäurederivate dar, das an Position 4 des Phenylrings eine *O*-Methylgruppe trägt. Vermutlich wurde durch die Mutation P285A die Substratbindetasche derart verändert, daß sie für Substrate, die an dieser Position eine *O*-Methylgruppe tragen, nicht mehr zugänglich ist. Alle anderen getesteten Zimtsäurederivate besaßen an Position 4 des Phenylrings eine Hydroxylgruppe und konnten alle aktiviert werden. Eine Ausnahme bildete die Zimtsäure, die keinen Substituenten trägt, aber auch von der Wildtyp-*Gm4CL1* nur schwach umgesetzt wurde. Abhängig von weiteren Substitutionen an Position 3 und 5 des Ringsystems wurden diese Zimtsäurederivate unterschiedlich effizient aktiviert, und zwar desto besser, je größer bzw. vielzähliger die Substituenten an diesen Positionen waren. Der Sinapinsäure-Umsatz wurde durch die Mutation P285A am geringsten beeinflusst. Dieses Substrat konnte möglicherweise aufgrund seiner beiden *O*-Methylgruppen in Stellung 3 und 5 am effektivsten in der Substratbindetasche gebunden werden, während Ferulasäure vermutlich aufgrund nur einer *O*-Methylgruppe (Position 3) schlechter als Substrat akzeptiert werden konnte. Kaffeesäure besitzt an Position 3 keine *O*-Methylgruppe, sondern eine kleinere, hydrophilere Hydroxylgruppe, weshalb möglicherweise die Substratbindung weiter eingeschränkt wurde. 4-Cumarsäure wurde von allen substituierten Zimtsäurederivaten am schlechtesten umgesetzt, da es neben der Hydroxylgruppe an Position 4 keinen weiteren Substituenten besitzt, der eine effektivere Bindung ermöglichte. Ferulasäure unterscheidet sich von 3,4-DMZ nur durch den Substituenten an Position 4. Sie besitzt hier anstelle der *O*-Methylgruppe eine Hydroxylgruppe und kann von *Gm4CL1*/P285A umgesetzt werden. Demzufolge könnte das Pro285 der *Gm4CL1* für die richtige Positionierung der Aminosäurereste verantwortlich sein, die direkt mit dem Substituenten an Position 4 des Phenylrings interagieren oder wäre möglicherweise selbst an der Substratbindung beteiligt.

Stuible und Kombrink (2001) ersetzten in *At4CL2* die Aminosäure Met293, die sich in unmittelbarer Umgebung zum VPP-Motiv befindet, sowie die Aminosäure Lys320 aus dem Motiv M5, jeweils durch eine kleinere Aminosäure (M293P, K320L). Dadurch erlangte diese

Arabidopsis-4CL-Isoform, die nur 4-Cumarsäure und Kaffeesäure umsetzen konnte, die Fähigkeit, Ferulasäure umzusetzen. Kaffeesäure und Ferulasäure unterscheiden sich an Position 3 des Phenylrings. Kaffeesäure besitzt hier eine Hydroxylgruppe, während Ferulasäure an dieser Stelle eine größere *O*-Methylgruppe trägt. Vermutlich wurde durch die Veränderung bei *At4CL2*, ähnlich wie bei den Mutationen V284A und P286A im VPP-Motiv der *Gm4CL1*, die Substratbindetasche vergrößert und die Bindung von Ferulasäure dadurch ermöglicht (Stuible und Kombrink, 2001). Ferner wurde postuliert, daß die Aminosäuren an Position 293 und 320 der *At4CL2* möglicherweise direkt mit der 3-Hydroxy- bzw. 3-Methoxygruppe der Zimtsäurederivate interagieren (Stuible und Kombrink, 2001). Es ist durchaus denkbar, daß die Zimtsäurederivate aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Substitutionsmuster am Phenylring nicht in exakt gleicher Position in der Substratbindetasche gebunden werden, so daß z. B. der Substituent an Position 3 von Ferulasäure mit anderen Aminosäuren interagiert als der Substituent an Position 3 von Sinapinsäure. Entscheidend für die Katalysereaktion ist die richtige Positionierung der α -Carboxylgruppe der Zimtsäurederivate, da an dieser Stelle die Aktivierung mit ATP bzw. CoA stattfindet.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Familie der Adenylat-bildenden Enzyme, so erkennt man, daß sich die Vertreter dieser Enzymgruppe vor allem in ihrem zu aktivierenden Substrat unterscheiden. Neben Zimtsäuren (4CL) werden z. B. mit Aminosäuren (Peptidsynthetasen), Luciferin (Luciferase) oder Fettsäuren (Acyl:CoA Synthetasen) strukturell sehr unterschiedliche Substrate aktiviert. Das bedeutet, daß innerhalb des aktiven Zentrums der Adenylat-bildenden Enzyme der Bereich für die Bindung der zu aktivierenden Substrate stärker variiert als der Bereich, in dem AMP gebunden wird. Dies zeigte sich auch im Vergleich der Primärsequenzen der Adenylat-bildenden Enzyme. Die Aminosäuren, die bei PheA für die AMP-Bindung verantwortlich sind, sind zum großen Teil auch bei den anderen Adenylat-bildenden Enzymen konserviert (Stuible et al., 2000; Chang et al., 1997; Anhang A7), während die Aminosäuren, die das zu aktivierende Substrat binden, sehr variabel sind.

Das zweite mittels „Alaninscanning“-Mutagenese untersuchte Motiv der *Gm4CL1* (Thr331-Met348, Motiv M6) entspricht in PheA einer Region, die bei der Bindung sowohl von AMP als auch von Phenylalanin beteiligt ist (Conti et al., 1997). Bei PheA sind die Aminosäuren Asn321, Ala322, Tyr323, Thr326 und Glu327 aus diesem Motiv für die Bindung von AMP verantwortlich. Das AMP wird über eine Wasserstoffbrücke zwischen der N6-Aminogruppe und dem Carbonyl-Sauerstoff des Ala322 und dem Sauerstoff der Seitenkette von Asn321 gebunden. Der Stickstoff der Seitenkette von Asn321 interagiert außerdem über ein Wassermolekül mit dem N1 des Purinringes. Tyr323 interagiert nicht direkt mit AMP, sondern stabilisiert über eine Wasserstoffbrücke zu Asp413 deren Kontakt zu AMP. Das α -Phosphat des AMP interagiert mit den Seitenketten von Thr326 und Glu327. Diese beiden Aminosäuren sind innerhalb der Adenylat-bildenden Enzyme hoch konserviert.

Das Ersetzen der den Aminosäuren Tyr323, Thr326 und Glu327 entsprechenden Reste der *Gm4CL1* durch Alanin führte zum völligen Verlust der Aktivität, so daß diese Aminosäuren möglicherweise auch bei 4CL an der Bindung von AMP beteiligt sind. Im Gegensatz dazu schien die Seitenkette der Aminosäure Gln334 der *Gm4CL1*, die der Aminosäure Asn321 von PheA entspricht, nicht an der AMP-Bindung teilzuhaben. Diese Aminosäure könnte an der Bindung der Zimtsäurederivate beteiligt sein, da die Mutante Q334A andere Substrate bevorzugte als die Wildtyp-*Gm4CL1*. Während von der Mutante Kaffeesäure und Sinapinsäure bevorzugt umgesetzt wurden, aktivierte die Wildtyp-*Gm4CL1* vornehmlich 4-Cumarsäure, Ferulasäure und 3,4-DMZ.

Zwei Aminosäuren, die in PheA ebenfalls in der Region angeordnet sind, die dem Motiv M6 der *Gm4CL1* entspricht, sind dort für die Bindung von Phenylalanin verantwortlich. Sowohl von Gly324 als auch von Ile330 bilden die Carbonyl-Sauerstoffatome Wasserstoffbrücken mit der α -Aminogruppe des zu aktivierenden Phenylalanins (Conti et al., 1997). Ferner ist das Cys331 Bestandteil der Höhle, in der der aromatische Rest des Phenylalanin untergebracht ist. Wurden die dazu homologen Aminosäuren der *Gm4CL1* durch Alanin ersetzt, so führte dies zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (G337A, L344A) bzw. zu einer stark verringerten Aktivität (P343A) der Mutanten. Das Substratmuster von P343A glich dabei dem der Wildtyp-*Gm4CL1*. Eventuell interagieren Gly337 und Pro343 entsprechend den homologen Aminosäuren von PheA (Gly324, Ile330) nicht mit dem Ringsystem der Zimtsäuren, sondern mit deren α -Carboxylgruppen und bringen diese in die ideale Position für die Katalyse. Leu344 und die Aminosäuren Gly333, Met338, Gly342, Ile346 und Met348 besitzen vermutlich eine wichtige Funktion in der Formgebung der Substratbindetasche oder in der Stabilisierung bzw. Positionierung benachbarter Substrat-bindender Aminosäuren, da ihre entsprechenden Alaninmutanten bis auf I346A alle zu inaktiven Proteinen führten. Es kann aber auch eine direkte Beteiligung an der Bindung von AMP, CoA oder der Zimtsäurederivate nicht ausgeschlossen werden.

Die Mutanten F283A und G335A ließen sich nicht herstellen. Sowohl das Phenylalanin als auch das Glycin könnte eine Rolle bei der Proteinfaltung und/oder der Proteinstabilisierung spielen, so daß eine Mutation an diesen Stellen den Abbau durch bakterielle Proteasen zur Folge hätte. Alaninmutanten, die sehr schwach oder nicht exprimiert wurden, traten beispielsweise auch bei der Mutationsanalyse des Rezeptors für das menschliche Wachstumshormon und des $K_V1.3$ Kaliumionenkanals auf (Cunningham und Wells, 1989; Hanner et al., 2001).

4.7 Valin-Deletion im Motiv M6 ermöglicht den Sinapinsäure-Umsatz

Durch weitere, gezielte Mutagenesen konnte einer spezifischen Position der Aminosäuresequenz des Motivs M6 die Fähigkeit zugeordnet werden, über den

Sinapinsäureumsatz zu entscheiden. Diejenige Aminosäure, deren auffälliges Fehlen in *Gm4CL1* mit der Fähigkeit Sinapinsäure umzusetzen korreliert werden konnte, könnte sowohl eine Größenveränderung der Substratbindetasche als auch eine Verschiebung funktionell wichtiger Aminosäuren verursachen. Die strukturelle Modellierung entsprechender Deletions- oder Insertionsmutanten zeigte eine veränderte Konformation der vom Motiv M6 gebildeten Schleife (Abb. 27). Als Folge der Valin-Deletion in *Gm4CL3* wurde das Leu368, das im Wildtyp von der Substratbindetasche weg gerichtet ist, in Richtung des Innenraums der Bindetasche gedreht. Damit nahm es hier eine ähnliche Position ein wie das entsprechende Leucin der *Gm4CL1* (Leu344). Daß dieses Leucin bei *Gm4CL1* eine bedeutende Funktion hinsichtlich der Enzymaktivität besitzt, wurde bereits aus der „Alaninscanning“-Mutagenese ersichtlich. Dort führte der Aminosäureaustausch L344A zu einem völligen Verlust der Enzymaktivität (Abb. 24B).

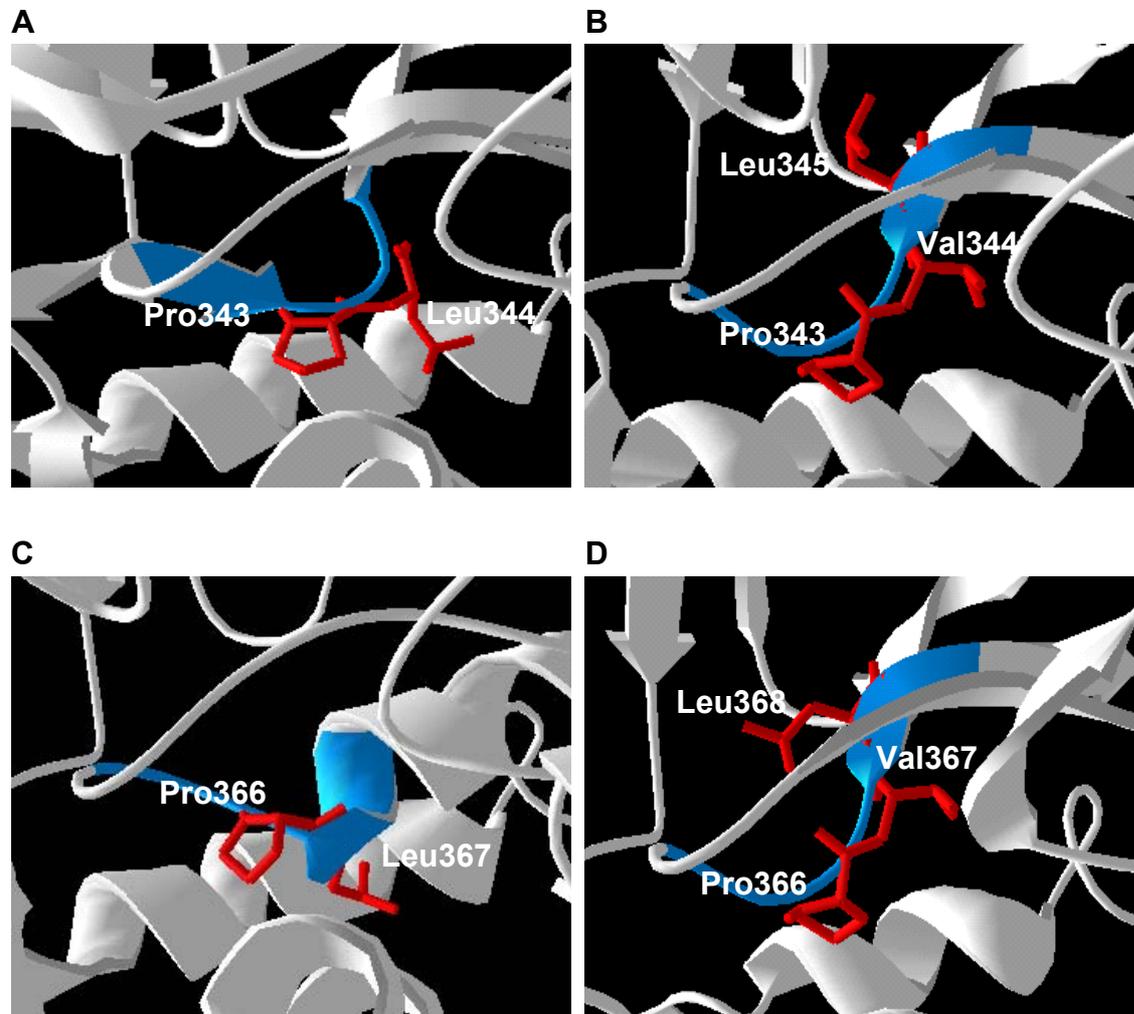
Obwohl die Deletion der jeweiligen Valinreste sowohl in *Gm4CL2* als auch in *Gm4CL3* die Fähigkeit, Sinapinsäure zu aktivieren, zur Folge hatte, wirkte sich die Mutation auf die Erweiterung der Substratspektren unterschiedlich aus. Bei *Gm4CL2dV345* wurde spezifisch der Umsatz nur von Sinapinsäure ermöglicht, wobei die katalytische Wirksamkeit (rel. V_{\max}/K_m) der ursprünglichen Substrate nicht beeinflußt wurden (Tab. 9). Daß *Gm4CL2dV345* 3,4-DMZ nicht umsetzen konnte, beruhte eventuell auf der *O*-Methylgruppe an Position 4 dieses Zimtsäurederivates, die den Zugang zur Substratbindetasche oder die optimale Positionierung des Substrates in der Bindetasche vermutlich verhinderte.

Weitaus drastischer wirkte sich die Valin-Deletion bei *Gm4CL3* aus. Die Mutation ermöglichte dieser Isoform nicht nur den Umsatz von Sinapinsäure und 3,4-DMZ, sondern verbesserte auch die Affinität gegenüber Ferulasäure. Obwohl die Identität der Aminosäuresequenzen zwischen *Gm4CL1* und *Gm4CL2* (63%) höher ist als zwischen *Gm4CL1* und *Gm4CL3* (58%), glich das Substratspektrum der *Gm4CL3dV367* dem der *Gm4CL1* (Tab. 9).

Trotz der Deletion einer Aminosäure in einem Motiv, das nicht nur die Substratspezifität der 4CL mit bestimmt, sondern sehr wahrscheinlich auch für die AMP-Bindung verantwortlich ist, wurde der Reaktionsmechanismus von *Gm4CL2* bzw. *Gm4CL3* nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu schien die Insertion eines Valins in die entsprechende Position der *Gm4CL1* die Substratbindetasche derart zu verändern, daß eine Zimtsäure-Aktivierung nicht mehr möglich war (*Gm4CL1iV344*). Im Strukturmodell der *Gm4CL1iV344* zeigte sich, daß durch die Einführung des Valin das nachfolgende Leucin aus der Bindetasche herausgedreht wurde und daß dadurch die vom Motiv M6 gebildete Schleife eine ähnliche Konformation einnehmen würde wie bei *Gm4CL3* (Abb. 27). Möglicherweise wirken sich diese Veränderungen aber auch auf die Bindung von AMP bzw. CoA aus, so daß die Katalyse nicht mehr durchgeführt werden kann.

Die Anwendbarkeit der gerichteten Mutation zur Einführung neuer Substratspezifitäten bei zwei deutlich voneinander verschiedenen 4CL-Isoformen deutet auf ein generelles Prinzip

hin. Die Deletion einer einzigen Aminosäure ermöglichte die Zugänglichkeit oder Bindung der hochsubstituierten Zimtsäurederivate. Mit geringem Aufwand könnte es also möglich sein, auch bei 4CL-Isoformen anderer Pflanzen das Substratspektrum zu erweitern.



E

<i>Gm4CL1</i>	333	GQYGMTE	AGP-LAIS	347
<i>Gm4CL1iV344</i>	333	GQYGMTE	AGPVLAIS	348
<i>Gm4CL3dV3</i>	356	GQYGMTE	AGP-LSMC	370
<i>Gm4CL3</i>	356	GQYGMTE	AGPVLSMC	371

Abb. 27: Mögliche Auswirkungen der Valin-Insertion in *Gm4CL1* (*Gm4CL1iV344*) bzw. Valin-Deletion bei *Gm4CL3* (*Gm4CL3dV367*) auf die Struktur der vom Sequenzmotiv M6 gebildeten Schleife der möglichen Substratbindetasche der jeweiligen *Gm4CL*-Isoform.

Die Vorhersage der Molekülstrukturen wurden mit dem Programm SWISS-MODEL (Peitsch, 1996; Guex et al., 1999) mit der Struktur der Luciferase als Matrizze durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm spdbViewer (Guex und Peitsch, 1997). Von *Gm4CL1* (A), *Gm4CL1iV344* (B), *Gm4CL3dV367* (C) und *Gm4CL3* (D) ist jeweils die vom Sequenzmotiv M6 gebildete Schleife dargestellt. Der Teil des Sequenzmotivs M6, der möglicherweise an der Zimtsäure-Bindung beteiligt ist, ist in den Strukturmodellen und im Sequenzvergleich (E) blau markiert. Die Seitenketten der Aminosäuren Prolin, Valin (falls vorhanden) und Leucin sind rot dargestellt.

4.8 Weitere mögliche Substratbindemotive

Sowohl *Gm4CL2dV345* als auch *Gm4CL3dV367* waren zwar in der Lage, Sinapinsäure umzusetzen, doch war die Effektivität wesentlich geringer als bei *Gm4CL1* (Tab. 9). Dies könnte bedeuten, daß neben dem fehlenden Valin noch weitere Unterschiede innerhalb der Substratbindetasche von *Gm4CL1*, *Gm4CL2* und *Gm4CL3* bestehen, die bei *Gm4CL1* für einen effizienten Sinapinsäure-Umsatz verantwortlich sind. Die drei *Gm4CL*-Isoformen unterschieden sich innerhalb der SdR in 103 (*Gm4CL1/Gm4CL2*) bzw. 105 (*Gm4CL1/Gm4CL3*) Aminosäuren. Mit den Motiven M3 und M5 wurden zwei weitere Bereiche betrachtet, die für die Festlegung der Substratspezifität verantwortlich sein könnten. In PheA waren die dazu homologen Motive an der Bildung der Höhle zur Unterbringung des aromatische Rests der zu aktivierenden Aminosäure beteiligt (Conti et al., 1997). Auch im Strukturmodell der *Gm4CL1* befanden sich beide Motive innerhalb der vorhergesagten Substratbindetasche (Abb. 23).

Die beiden Aminosäuren Gly317 und Gln320 der *Gm4CL1*, die C-terminal vom Motiv M5 gelegen sind und bei allen anderen 4CLs überhaupt nicht oder nur sehr selten vorkommen, schienen allerdings hinsichtlich des Sinapinsäure-Umsatzes nicht von Bedeutung zu sein. Zumindest konnte die Aktivierung von Sinapinsäure der *Gm4CL2dV345* durch den Austausch der Aminosäuren E321Q bzw. E321Q/K318G nicht verbessert werden. Dieses Ergebnis schließt aber eine Beteiligung des Motiv M5 an der Bildung der Substratbindetasche nicht aus. Durch den Austausch einer Aminosäure (K320A) im Motiv 5 der 4CL-Isoform 2 aus *Arabidopsis* wurde der Umsatz von Ferulasäure ermöglicht (Stuible und Kombrink, 2001). Diese Modifikation einer Seitenkette des Proteins führte vermutlich zur Vergrößerung der Substratbindetasche, so daß *At4CL2/K320A* in der Lage war, neben 4-Cumarsäure und Kaffeesäure auch das nächst höher substituierte Zimtsäurederivat zu binden und zu aktivieren. Die Funktion des Motivs M3 wurde in 4CL bisher noch nicht untersucht. Dennoch deutete sowohl die Lage dieses Motivs im Strukturmodell der *Gm4CL1* als auch die Funktion des homologen Bereichs der PheA (Conti et al., 1997) darauf hin, daß diese Peptidsequenz auch bei 4CL an der Substratbindung beteiligt sein könnte. Innerhalb dieses Motivs wies die *Gm4CL1* allerdings keine Sequenzunterschiede zu den anderen 4CLs auf, die in Verbindung mit dem Sinapinsäure-Umsatz zu bringen wären.

Neben den Motiven, die direkt an der Bildung der Substratbindetasche beteiligt sind, können auch Regionen, die an die Substratbindetasche angrenzen, deren Konformation beeinflussen. Der 4CL2 aus *Arabidopsis* konnte beispielsweise durch Austausch von vier Aminosäuren im Bereich der Box II (GEICIRG) die Fähigkeit verliehen werden, Ferulasäure umzusetzen (Ehltling et al., 2001). Möglicherweise interagieren Aminosäuren, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesem Motiv befinden, mit Aminosäuren der Substratbindetasche und beeinträchtigen dadurch indirekt die Struktur der Substratbindetasche (Ehltling et al., 2001). Ursprünglich wurde dem GEICIRG-Motiv aufgrund seines zentralen Cysteins eine

Beteiligung an der Katalyse der Adenylat-bildenden Enzyme zugeschrieben (Becker-André et al., 1991). Der jeweilige Austausch dieses Cysteins sowohl in *At4CL2* als auch in Luciferase aus *P. phyalis* und in Tyrocidinsynthetase aus *B. brevis*, führte allerdings nur zu geringen Beeinträchtigungen der jeweiligen Enzymaktivität (Gocht und Marahiel, 1994; Ohmiya und Tsuji, 1997; Stuible et al., 2000). Auch der Austausch des positiv geladenen Arginins gegen ein hydrophobes Isoleucin in *Gm4CL1* hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität (Anhang A8). Ferner konnte bei PheA eine direkte Interaktion zwischen dem Substrat und Aminosäureresten dieses Motivs (GEICIGG) ausgeschlossen werden (Conti et al., 1997). Auch in der Kristallstruktur der Luciferase (Conti et al., 1996) und dem Strukturmodell der *Gm4CL1* ist dieses Motiv kein Bestandteil der vorhergesagten Substratbindetasche. Diesen Ergebnissen zufolge scheint die Box II kein Teil der Substratbindetasche darzustellen, wengleich die vorhergesagte Struktur der *Gm4CL1* ein Modell darstellt und nicht der Realität entsprechen muß.

4.9 Ausblick

Phenylpropanoide besitzen in Pflanzen viele unterschiedliche Funktionen. Sie dienen z. B. als Schutzsubstanzen gegen biotischen und abiotischen Streß, als Farbpigmente, Signalmoleküle und Strukturkomponenten. Weiterhin gewannen einige Phenylpropanoide durch ihre antioxidative Wirkung und ihre Aktivität gegen Krebs auch Bedeutung als Gesundheitsfördernde Naturstoffe. Aus diesem Grund besteht ein hohes Interesse an der Modifikation des Phenylpropanstoffwechsels, um die Produktion gewünschter Phenylpropanoide zu fördern bzw. die Produktion unerwünschter Substanzen zu hemmen. Beispielsweise ist das Lignin im Gegensatz zu seiner großen Bedeutung für das Wachstum der Pflanzen bei der Herstellung von Zelluloseprodukten unerwünscht. Es muß mit erheblichem Energie- und Kostenaufwand entfernt werden, wobei Angiospermen-Lignin aufgrund des höheren Methylierungsgrades der Syringyl-Einheiten besser degradiert werden kann als Gymnospermen-Lignin. Daher ist man seit langem bestrebt, für die Papierherstellung Pflanzen mit geringerem Ligninanteil bzw. erhöhtem Syringyl-Anteil zu züchten.

Die 4CL stellt als zentrales Enzym des Phenylpropanstoffwechsels ein mögliches Ziel für Veränderungen dar. Durch Kombination von Genen, die für 4CLs mit gewünschten Substratspezifitäten kodieren, und Promotorelementen für organ-, zell- oder stimuluspezifische Expression könnten derartige Modifikationen des Phenylpropanstoffwechsels erreicht und reguliert werden. Um 4CLs mit definierten Substratspezifitäten herstellen zu können, sind allerdings noch weitere Kenntnisse über die Art der Bindung der verschiedenen Zimtsäurederivate durch 4CL nötig. Die Kristallisierung dieses Enzyms mit ihren gebundenen Substraten könnte hier wichtige Informationen liefern.

5 Zusammenfassung

Die 4-Cumarat:Coenzym A Ligase (4CL) ist ein Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels, das aktivierte Hydroxyzimtsäure-Ester zur Synthese spezifischer Phenylpropanoide bereitstellt. In vielen Pflanzen kommen strukturell und funktionell sehr ähnliche 4CL-Isoformen vor, weshalb diesem Enzym dort nur eine beschränkte regulatorische Funktion bei der Verteilung der unterschiedlich substituierten Zimtsäurederivate für nachfolgende Synthesen zugesprochen wird. Durch Isolierung der cDNA der von Knobloch und Hahlbrock (1975) partiell gereinigten Ligase 1 und der Vervollständigung der kodierenden Sequenz der *Gm4CL4* konnte mit großer Wahrscheinlichkeit die Genfamilie der Sojabohne-4CLs komplettiert werden. Mit der cDNA der *Gm4CL1* war außerdem erstmals eine 4CL-Sequenz verfügbar, die für eine Sinapinsäure-umsetzende 4CL kodiert. Zusammen mit den bereits beschriebenen 4CL-Isoenzymen 2 und 3 (Uhlmann und Ebel, 1993; Möllers, 1997) existieren in Sojabohne somit mindestens vier 4CL-Isoformen.

Die unterschiedlichen Substratspezifitäten der rekombinanten Proteine, die Fähigkeit, die gesamte Gruppe der pflanzlichen Hydroxyzimtsäuren zu aktivieren und die differentielle Synthese der *Gm4CL*-Isoformen nach Elicitor-Behandlung von Sojabohnenzellkulturen bzw. Infektion von Sojabohnekeimlingen weisen auf eine bedeutende regulatorische Funktion der 4CL hinsichtlich der Bereitstellung unterschiedlich substituierter Zimtsäurederivate zur Synthese spezifischer Phenylpropanoide in Sojabohne hin. Dabei scheinen *Gm4CL1* und *Gm4CL2* vor allem an der Synthese von Phenylpropanoiden beteiligt zu sein, die für Wachstum und Entwicklung der Pflanzen benötigt werden, während *Gm4CL3* und *Gm4CL4* aktivierte Zimtsäuren bereitstellen, die aufgrund von Umweltveränderungen benötigt werden.

Die 4CL wird mit Acyl-CoA Ligasen, Peptidsynthetasen und Luciferase zur Familie der AMP-bindenden Proteine zusammengefaßt. Diesen Enzymen ist nicht nur der Mechanismus der AMP-Aktivierung gemeinsam, sondern sie besitzen auch Ähnlichkeiten in ihren Proteinstrukturen. Durch Bildung von Hybridenzymen zwischen *Gm4CL1* und *Gm4CL3* konnte der zentrale Sequenzbereich der 4CL als Substratspezifität-determinierende Region ermittelt werden. Mit Hilfe der Informationen, die von der Kristallstruktur der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase gewonnen wurden, konnten vier mögliche Substratbindemotive der 4CL identifiziert werden. Innerhalb eines dieser Motive unterscheidet sich die *Gm4CL1* von allen anderen bisher klonierten 4CLs durch den Verlust eines Aminosäurerestes, wodurch die *Gm4CL1* in der Lage ist, hochsubstituierte Zimtsäurederivate zu aktivieren. Wird der entsprechende Aminosäurerest der *Gm4CL2* (*Gm4CL2dV345*) und *Gm4CL3* (*Gm4CL3dV367*) entfernt, können beide Deletionsmutanten Sinapinsäure umsetzen. Außerdem ist *Gm4CL3dV367* in der Lage, 3,4-Dimethoxyzimtsäure zu aktivieren und zeigt eine deutlich erhöhte Affinität gegenüber Ferulasäure. Durch das Entfernen einer einzigen Aminosäure können somit hochsubstituierte Zimtsäurederivate

umgesetzt werden. Die Möglichkeit, die Substratspezifität dieses zentralen Enzymes des Phenylpropanstoffwechsels zu modifizieren, eröffnet die Herstellung transgener Pflanzen mit gewünschtem Phenylpropanoid-Profil.

6 Literaturverzeichnis

Allina S.M., Pri-Hadash A., Theilmann D.A., Ellis B.E., Douglas C.J. (1998) 4-coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar. *Plant Physiol.* 116, 743-754.

Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-83.

Bach M., Schnitzler J.P., Seitz H.U. (1993) Elicitor-induced changes in Ca^{2+} influx, K^{+} efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplasts of *Daucus carota* L. *Plant Physiol.* 103, 407-412.

Bairoch A. (1991) Putative AMP-binding domain signature. PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins, Release 8.00. Medical Biochemistry Department, University of Geneva, Switzerland.

Becker-André M., Schulze-Lefert P., Hahlbrock K. (1991) Structural comparison, modes of expression, and putative *cis*-acting elements of the two 4-coumarate:CoA ligase genes in potato. *J. Biol. Chem.* 266, 8551-8559.

Bent A. (1996) Function meets structure in the study of plant disease resistance genes. *Plant Cell* 8, 1757-1771.

Birnboim H.C. and Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523

Black P.N., Zhang Q., Weimar J.D., DiRusso C.C. (1997) Mutational analysis of a fatty acyl-Coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 272, 4896-4903.

Boller T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 189-214.

Bonhoff A., Rieth B., Golecki J., Grisebach H. (1987) Race cultivar-specific differences in callose deposition in soybean roots following infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Planta* 172, 101-105.

Boudet A.M. (1998) A new view of lignification. *Trends Plant Sci.* 3, 67-71.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 282, 152-160.

Brisson L.F., Tenhaken R., Lamb C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703-1712.

- Bush D.S. (1993) Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* 103, 7-13.
- Chang S., Purjear J., Cairney J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113-116.
- Chang K.H., Xiang H., Dunaway-Mariano D. (1997) Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate/thioester-forming enzyme superfamily: A site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas* sp. strain CBS 4-chlorobenzoate:coenzyme A ligase. *Biochem.* 36, 15650-15659.
- Chapple C.C.S., Vogt T., Ellis B.E., Somerville C.R. (1992) An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4; 1413-1424.
- Cheng S.H., Sheen J., Gerrish C., Bolwell G.P. (2001) Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett.* 503, 185-188.
- Conti E., Franks N.P., Brick P. (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzyme. *Structure* 4, 287-298.
- Conti E., Stachelhaus T., Marahiel M.A., Brick P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* 16, 4174-4183.
- Cosio E.G., Frey T., Ebel J. (1992) Identification of a high-affinity binding protein for a hepta- β -glucoside phytoalexin elicitor in soybean. *Eur. J. Biochem.* 204, 1115-1123.
- Cukovic D., Ehltling J., VanZiffle J.A., and Douglas C.J. (2001) Structure and evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene families. *Biol. Chem.* 382, 645-654.
- Cunningham B.C. and Wells J.A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanin-scanning mutagenesis. *Science* 244, 1081-1085.
- Dangl J.L. and Jones J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Davin L.B. and Lewis N.G. (2000) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* 123, 453-461.
- Deshpande A.S., Surendranathan K.K., Nair P.M. (1993) The phenylpropanoid pathway enzymes in *Solanum tuberosum* exist as a multienzyme complex. *Indian J. Biochem. Biophys.* 30, 36-41.
- Dharmatilake A.J. and Bauer W.D. (1992) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1153-1158.

Dharmawardhana D.P., Ellis B.E., Carlson J.E. (1995) A β -Glycosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* 107, 331-339.

Dixon R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.

Dixon R.A., Chen F., Guo D., Parvathi K. (2001) The biosynthesis of monolignols: a „metabolic grid“, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochem.* 57, 1069-1084.

Dixon R.A. and Paiva N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.

Dixon R.A. and Steel C.L. (1999) Flavonoids and Isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4, 394-400.

Douglas C.J. (1996) Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Biochem. Sci.* 1, 171-178.

Douglas C.J., Hoffmann H., Schulz W., Hahlbrock K. (1987) Structure and elicitor or u.v.-light-stimulated expression of two 4-coumarate:CoA ligase genes in parsley. *EMBO J.* 6, 1189-1195.

Draper J., Scott R., Armitage P., Walden R. (1988) *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Drobak B.K. (1993) Plant phosphoinositides and intracellular signalling. *Plant Physiol.* 102, 705-709.

Dröge-Laser W., Kaiser A., Lindsay G.J., Halkier B.A., Loake B.J., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C. (1997) Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defense. *EMBO J.* 16, 726-738.

Ebel J. (1998) Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *BioEssays* 20, 569-576.

Ebel J., Ayers A.R., Albersheim P. (1976) Host-pathogen interactions XII: Response of suspension-cultured soybean cells to the elicitor isolated from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, a fungal pathogen of soybeans. *Plant Physiol.* 57, 775-779.

Ebel J., Bhagwat A.A., Cosio E.G., Feger M., Kissel U., Mithöfer A., Waldmüller T. (1995) Elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of a phytoalexin defense response. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1), 506-510.

Ebel J. and Cosio E.G. (1994) Elicitors of plant defense responses. *Intern. Rev. Cytol.* 148, 1-36.

- Ebel J. and Grisebach H. (1988) Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: a molecular analysis. Trends Biochem. Sci. 13, 23-27.
- Ebel J. and Mithöfer A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. Planta 206, 335-348.
- Ebel J., Schaller-Hekeler B., Knobloch K.H., Wellmann E., Grisebach H., Hahlbrock K. (1974) Coordinated changes in enzyme activities of phenylpropanoid metabolism during the growth of soybean cell suspension cultures. Biochim. Biophys. Acta 362, 417-424.
- Ebel J. and Scheel D. (1992) Elicitor recognition and signal transduction. In: Boller T., Meins F. (eds) Plant gene research. Genes involved in plant defense. Springer, Vienna, 183-205.
- Ebel J. and Scheel D. (1997) Signals in host-parasite interactions. In: The Mycota V Part A Plant Relationships, (Eds.: G.C. Carroll, P. Tudzynski), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 85-105.
- Ebel J., Schmidt W.E., Loyal R. (1984) Phytoalexin synthesis in soybean cells: Elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcon synthase mRNA and correlation with phytoalexin accumulation. Arch. Biochem. Biophys. 232, 240-248
- Ehrling J., Büttner D., Wang Q., Douglas C.J., Somssich I.E., Kombrink E. (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. Plant J. 19, 9-20.
- Ehrling J., Shin J.J.K., Douglas C.J. (2001) Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. Plant J. 27, 455-465.
- Ellis J., Dodds P., Pryor T. (2000) Structure, function, and evolution of plant disease resistance genes. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 278-284.
- Elstner E.F., Oßwald W., Schneider I. (1996) Phytopathologie - Allgemeine und biochemische Grundlagen. Spektrum, Akad. Verl.; Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Eye L.L., Sneh B., Lockwood J.L. (1978) Factors affecting zoospore production by *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathol. 68, 1766-1768.
- Farmer E.E. (1985) Effects of fungal elicitor on lignin biosynthesis in cell suspension cultures of soybean. Plant Physiol. 78, 338-342.
- Felix G., Regenass M., Boller T. (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. Plant J. 4, 307-316.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.

- Ferrer J.L., Jez J.M., Bowman M.E., Dixon R.A., Noel J.P. (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* 6, 775-784.
- Fliegmann J., Schröder G., Schanz S., Britsch L., Schröder J. (1992) Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.* 18, 489-503.
- Fulda M., Heinz E., Wolter F.P. (1994) The *fadD* gene of *Escherichia coli* K12 is located close to *rnd* at 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family. *Mol. Gen. Genet.* 242, 241-249.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- Gocht M. and Marahiel M.A. (1994) Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase *TycA* by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* 176, 2654-2662.
- Gottesmann S., Halpern E., Trisler P. (1981) Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by Ion mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 148, 265-273.
- Grand C., Boudet A., Boudet A.M. (1983) Isoenzymes of hydroxycinnamate:CoA ligase from poplar stems properties and tissue distribution. *Planta* 158, 225-229.
- Gross G.G. und Zenk M.H. (1966) Darstellung und Eigenschaften von Coenzym A-Thiolester substituiertes Zimtsäuren. *Z. Naturforsch.* 21b, 683-690.
- Guex N., Diemand A., Peitsch M.C. (1999) Protein modelling for all. *Trends Biochem. Sci.* 24, 364-367.
- Guex N. and Peitsch M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18; 2714-2723.
- Guo D., Chen F., Inoue K., Blount J.W., Dixon R.A. (2001) Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell* 13, 73-88.
- Hahlbrock K. (1975) Further studies on the relationship between the rates of nitrate uptake, growth and conductivity changes in the medium of plant cell suspension cultures. *Planta* 124, 311-318
- Hahlbrock K., Kuhlen E., Lindl T. (1971) Änderungen von Enzymaktivitäten während des Wachstums von Zellsuspensionskulturen von *Glycine max*: Phenylalanin Ammonium-Lyase und p-Cumarat:CoA Ligase. *Planta* 99, 311-318.

Hahlbrock K. and Scheel D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 347-469.

Hahn M.G., Bonhoff A., Grisebach H. (1985) Quantitative localization of the glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Physiol.* 77, 591-601.

Hahn M.G., Darvill A.G., Albersheim P. (1981) Host-pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* 68, 1161-1169.

Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.

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

Hanner M., Grenn B., Gao Y.D., Schmalhofer W.A., Matyskiela M., Durand D.J., Felix J.P., Linde A.R., Bordallo C., Kaczorowski G.J., Kohler M., Garcia M.L. (2001) Binding of correolide to the K_v1.3 potassium channel: Characterization of the binding domain by site-directed mutagenesis. *Biochem.* 40, 11687-11697.

Hatfield R. and Vermerris W. (2001) Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol.* 126, 1351-1357.

Heller W. and Forkmann G. (1993) Biosynthesis of flavonoids. In: *The Flavonoids: Advances in research.* (Ed.: J. B. Harborne), Chapman and Hall, London, pp 499-535.

Higuchi T. (1985) Biosynthesis of lignin In: Higuchi T (Ed.), *Biosynthesis and Biodegradation of Wood components*, Academic Press, Orlando, FL, 141-160.

Higuchi T. (1997) In: *Biochemistry and Molecular Biology of Wood* (Springer New York), 131-233.

Hille A., Purwin C., Ebel J. (1982) Induction of enzymes of phytoalexin synthesis in cultured soybean cells by an elicitor from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Cell Reports* 1, 123-127.

Hrazdina G. and Wagner G.J. (1985) Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 237, 88-100.

Hu W.J., Kawaoka A., Tsai C.J., Lung J., Osakabe K., Ebinuma H., Chiang V.L. (1998) Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5407-5412

Humphreys J.M., Hemm M.R., Chapple C. (1999) New routes for biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10045-10050.

Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbrock K., Scheel D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4800-4805.

Jones J.D.G. (2001) Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. Curr. Opin. Plant Biol. 4, 281-7.

Keen N.T., Partridge J.E., Zaki A.J. (1972) Pathogen-produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybeans monogenically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathol. 62, 768.

Kneusel R.E., Matern U., Nicolay K. (1989) Formation of *trans*-caffeoyl-CoA from *trans*-4-coumaroyl-CoA by Zn²⁺-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. Arch. Biochem. Biophys. 269, 455-462.

Knobloch H.K. and Hahlbrock K. (1975) Isoenzymes of p-coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max*. Eur. J. Biochem. 52, 311-320.

Knogge W. und Scheel D. (1992) Resistenz von Pflanzen gegenüber pathogenen Pilzen. In: Pflanzenproduktion und Biotechnologie, Hrsg.: Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, Druck- und Verlags GmbH Becher, Brühl, 135-154.

Kühnl T., Koch U., Heller W., Wellmann E. (1987) Chlorogenic acid biosynthesis: characterization of a light-induced microsomal 5-*O*-(4-Coumaroyl)-D-quinic/shikimate 3'-hydroxylase from carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures. Arch. Biochem. Biophys. 258, 226-232.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

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

Lanz T., Tropf S., Marner F.J., Schröder J., Schröder G. (1991) The role of cysteines in polyketide synthases. J. Biol. Chem. 266, 9971-9976.

Lee D. and Douglas C.J. (1996) Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:Coenzyme A ligase (*4CL*) gene family. Plant Physiol. 112, 193-205.

Lee D., Meyer K., Chapple C., Douglas C.J. (1997) Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition. Plant Cell 9, 1985-1998.

Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.

Li L., Popko J.L., Umezawa T., Chiang V.L. (2000) 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J. Biol. Chem.* 275, 6537-6545.

Ligterink W., Kroj T., zur Nieden U., Hirt H., Scheel D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276, 2054-2057.

Lim E.K., Li Y., Parr A., Jackson R., Ashford D.A., Bowles D.J. (2001) Identification of glycosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 276, 4344-4349.

Lipmann F. (1980) Bacterial production of antibiotic polypeptides by thiol-linked synthesis on protein templates. *Adv. Microb. Physiol.* 21, 227-66.

Lozoya E., Hoffmann H., Douglas C.J., Schulz W., Scheel D., Hahlbrock K. (1988) Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by two 4-coumarate:CoA ligase genes in parsley. *Eur. J. Biochem.* 176, 661-667.

Lüderitz T. and Grisebach H. (1982) Enzymatic synthesis of lignin precursors: Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol:NADP⁺ dehydrogenase from (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Biochem.* 119, 115-124.

Lukacin R., Schreiner S., Matern U. (2001) Transformation of acridone synthase to chalcone synthase. *FEBS Lett.* 508, 413-417.

Mehdy M.C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105, 467-472.

Mithöfer A., Daxberger A., Fromhold-Treu D., Ebel J. (1997) Involvement of an NAD(P)H oxidase in the elicitor-inducible oxidative burst of soybean. *Phytochem.* 45, 1101-1107.

Mithöfer A., Ebel J., Bhagwat A.A., Boller T., Neuhaus-Url G. (1999) Transgenic auqorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* 207, 566-574.

Mithöfer A., Fliegmann J., Daxberger A., Ebel C., Neuhaus-Url G., Bhagwat A.A., Keister D.L., Ebel J. (2001) Induction of H₂O₂ synthesis by β -glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Lett.* 508, 191-195.

Mithöfer A., Fliegmann J., Neuhaus-Url G., Schwarz H., Ebel J. (2000) The hepta- β -glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biol. Chem.* 381, 705-713.

- Mithöfer A., Lottspeich F., Ebel J. (1996) One-step purification of β -glucan elicitor-binding protein from soybean (*Glycine max* L.) roots and characterization of an anti-peptide antiserum. FEBS Lett. 381, 203-207.
- Möllers B. (1997) Charakterisierung differentiell exprimierter Gene der 4-Cumarat:CoA Ligase in Zellkulturen der Sojabohne (*Glycine max* L.). Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Neish A.C. (1968) Constitution and Biosynthesis of Lignin. In: Freudenberg K., Neish A.C. (Eds.) Springer-Verlag, Berlin, 2-43.
- Nelson M. and McClelland M. (1992) Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. Meth. Enzymol. 216, 279-303.
- Nürnberger T. and Scheel D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. Trends Plant Sci. 6, 372-379.
- Ohmiya Y. and Tsuji F.I. (1997) Mutagenesis of firefly luciferase shows that cysteine residues are not required for bioluminescence activity. FEBS Lett. 404, 115-117.
- Osakabe K., Tsao C.C., Li L., Popko J.L., Umezawa T., Carraway D.T., Smeltzer R.H., Joshi C.P., Chiang V. (1999) Coniferyl aldehyd 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8955-8960.
- Papworth C., Braman J., Wright D.A. (1996) Site-Directed Mutagenesis in one day with >80% Efficiency. Strategies 9, 3-4.
- Parvathi K., Chen F., Guo D., Blount J.W., Dixon R.A. (2001) Substrate preferences of *O*-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-*O*-methylation of monolignols. Plant J. 25, 193-202.
- Peitsch M.C. (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. Biochem. Soc. Trans. 24; 274-279.
- Ragg H., Kuhn D.N., Hahlbrock K. (1981) Coordinated regulation of 4-coumarate:CoA ligase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA in cultured plant cells. J. Biol. Chem. 256, 10061-10065.
- Ralph J., Marita J.M., Ralph S.A., Hatfield R.D., Lu F., Ede R.M., Peng J., Quideau S., Helm R.F., Grabber J.H., Kim H., Jimenez-Monteon G., Zhang Y., Jung H.J.G., Landucci L.L., MacKay J.J., Sederoff R.R., Chapple C., Boudet A.M. (1999) Progress in Lignocellulosics Characterization. In: Argyropoulos D.S., Rials T. (Eds.), TAPPI Press, Atlanta, GA, 55-108.
- Ranjeva R., Boudet A., Faggioux R. (1976) Phenolic metabolism in petunia tissues. IV.- Properties of p-coumarate:Coenzyme A ligase isoenzymes. Biochimie 58, 1255-1262.

- Renelt A., Colling C., Hahlbrock K., Nürnberger T., Parker J.E., Sacks W.R., Scheel D. (1993) Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defence. *J. Exp. Bot.* 44, 257-268.
- Richter G. (1988) *Stoffwechselfysiologie der Pflanze*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 5. Auflage.
- Romeis T., Piedras P., Jones J.D. (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12, 803-815.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74; 5463-5467.
- Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn A., Meyer D., Ullmann P., Werck-Reichhart D. (2001) CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 36566-74.
- Schopfer C.R. (1998) Isolierung elicitorinduzierbarer CYPs aus Sojabohne (*Glycine max* L.) sowie Identifizierung und funktionelle Expression von cDNA-Klonen für die Zimtsäure 4-Hydroxylase und die Dihydroxypterocarpan 6a-Hydroxylase. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schopfer C.R., Kochs G., Lottspeich F., Ebel J. (1998) Molecular characterization and functional expression of dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase, an enzyme specific for pterocarpanoid phytoalexin biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.). *FEBS Lett.* 432, 182-186.
- Sederoff R.R., MacKay J.J., Ralph J., Hatfield R.D. (1999) Unexpected variation in lignin. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 145-152.
- Sharp J.K., Mc Nail M., Albersheim P. (1984a) The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *J. Biol. Chem.* 259, 11321-11336.
- Sharp J.K., Valent B., Albersheim P. (1984b) Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* 259, 11312-11320.
- Short J.M., Fernandez J.M., Sorge J.A., Huse W.D. (1988) λ Zap: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* 16, 7583-7600.
- Somssich I.E. and Hahlbrock K. (1998) Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90

- Strack D. and Bohern M. (1984) Metabolic activity of hydroxycinnamic acid glucose esters in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. Z. Naturforsch. 39c, 902-907.
- Stuible H.P., Büttner D., Ehltng J., Hahlbrock K., Kombrink E. (2000) Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. FEBS Lett. 467, 117-122.
- Stuible H.P. and Kombrink E. (2001) Identification of the substrate specificity-coferring amino acid residues of 4-coumarate:coenzyme A ligase allows the rational design of mutant enzymes with new catalytic properties. J. Biol. Chem. 276, 26893-26897.
- Swofford D.L. (1998) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, Version 4.0b1, Computer program distributed by the Illinois Natural Survey, Champaign, IL, USA.
- Tanaka M. and Kojima M. (1991) Purification and characterization of *p*-coumaroyl-D-glucose hydroxylase of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. Arch. Biochem. Biophys. 284, 151-157.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res., submitted, June 1994.
- Uhlmann A. and Ebel J. (1993) Molecular cloning and expression of 4-coumarate:coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance response of soybean (*Glycine max* L.) against pathogen attack. Plant Physiol. 102, 1147-1156.
- Wallis P.J. and Rhodes M.J.C. (1977) Multiple forms of hydroxycinnamate:CoA ligase in etiolated pea seedling. Phytochem. 16, 1891-1894.
- Welle R., Schröder G., Schiltz E., Grisebach H., Schröder J. (1991) Induced plant responses to pathogen attack. Analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. Harosoy 63). Eur. J. Biochem. 196, 423-430.
- Wells J.A. (1991) Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces. Methods Enzymol. 202, 390-411.
- Westermeier A. (1990) Elektrophorese-Praktikum. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Whetten R.W., MacKay J.J., Sederoff R.R. (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 49; 585-609.
- Wyrambik D. and Grisebach H. (1975) Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures. Eur. J. Biochem. 59, 9-15.
- Wyrambik D. and Grisebach H. (1979) Enzymic synthesis of lignin precursors. Eur. J. Biochem. 97, 503-509.

Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985) Improved phage M13 cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

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

Yotsushima K., Mitsui T., Takaoka T., Hayakawa T., Igaue I. (1993) Purification and characterization of membrane-bound inositol phospholipid-specific phospholipase C from suspension-cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant Physiol.* 102, 165-172.

Zagurski R.J. and Berman M.L. (1994) Cloning vectors that yield high levels of single-stranded DNA for rapid DNA sequencing. *Gene* 27, 183-190.

Zhang X.H. and Chiang V.L. (1997) Molecular cloning of 4-coumarate:coenzyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood. *Plant Physiol.* 113, 65-74.

7 Anhang

A1: Zusammenstellung der verwendeten PCR-Programme

Tab. 11: PCR-Programme

Schritt	P1		P2	P3	P4
1	94°C/180 s		94°C/180 s	94°C/120 s	94°C/120 s
2	1-25	26-35	35	35	35
3	94°C/45 s	94°C/45 s	94°C/45 s	94°C/30 s	94°C/30 s
4	52,5°C→55°C/60 s $\Delta 0,1^\circ\text{C}/\text{Zyklus}$	55°C/60 s	54,5°C→58°C/60 s $\Delta 0,1^\circ\text{C}/\text{Zyklus}$	60°C/45 s	40°C/30 s
5	72°C/120 s	72°C/120 s	72°C/90 s	72°C/180 s	73°C/60 s
6	72°C/600 s		72°C/600 s	72°C/600 s	73°C/600 s
7	4°C/∞		4°C/∞	4°C/∞	4°C/∞

Schritt	P5	P6	P7	P8	P9
1	94°C/120 s				
2	35	35	35	35	18
3	94°C/30 s	94°C/45 s	94°C/45 s	94°C/45 s	94°C/35 s
4	40°C/40 s	42°C/30 s	52°C/30 s	50°C/30 s	55°C/45 s
5	72°C/150 s	72°C/240 s	72°C/240 s	72°C/180 s	72°C/720 s
6	72°C/600 s				
7	4°C/∞	4°C/∞	4°C/∞	4°C/∞	4°C/∞

Die einzelnen Schritte haben folgende Bedeutung: 1: Aufschmelzen des Matrizen-DNA-Doppelstranges, 2: Anzahl der Amplifizierungszyklen zwischen Schritt 3 und Schritt 5, 3: Aufschmelzen der Kopie-DNA-Doppelstränge, 4: Binden der Oligonukleotide, 5: Verlängerung der Oligonukleotide, 6: Vervollständigung aller Stränge, 7: Pause. Temperaturänderungen wurden mit einer Geschwindigkeit von $\Delta 0,1^\circ\text{C}/\text{s}$ durchgeführt.

A2: Nukleotidsequenz der *Gm4CL1*-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz

<i>Gm4CL1</i>	AAAGTCGC AAAAATTCCTCCTACACCAAAAAATGGCACCTTCCACAAGAAATCATCTTCCGATCCCCACTCCCC	80
	M A P S P Q E I I F R S P L P	15
	N-terminales Peptid	
<i>Gm4CL1</i>	GATATTC CAATCCCCACACATCTCCATTGTACTCTTACTGCTTCCAAAACCTGTGCACAGTCCATGACCGTCCATGCCT	160
	D I P I P T H L P L Y S Y C F Q N L S Q F H D R P C L	42
	SalI	
<i>Gm4CL1</i>	CATCGACGGCGACACCGGGCAGACCCTCACCTACGCCGAC ETCGAC TTCGCTGCTCGCCGCATCGCCTCCGG CTCCACA	240
	I D G D T G E T L T Y A D V D L A A R R I A S G L H 26	68
	4CL1-GSP2 4CL1-GSP1	
<i>Gm4CL1</i>	AAATCGGCATCCG CCAGGGTGACGTCATC ATGCTCGTCTACGCAAC TGCCCGCAGTTGCCTCGCCTTCCTCGGGCGCC	320
	K I G I R Q G D V I M L V L R N C P Q F A L A F L G A	95
<i>Gm4CL1</i>	ACCCACCGTGGCGCCGTCGTCACCACAGCCAACCCCTTCTACACGCCGGCGAGCTTGCAGCAAGCGACGGCCACGAA	400
	T H R G A V V T T A N P F Y T P A E L A K Q A T A T K	122
<i>Gm4CL1</i>	AACCAGGCTCGTCATAACGCAATCCGCGTACGTAGAGAAAATCAAGAGTTTCGCGGACAGCAGCAGCGATGTCATGGTGA	480
	T R L V I T Q S A Y V E K I K S F A D S S S D V M V	148
	Peptid-S2	
<i>Gm4CL1</i>	TGTGCATTGATGATGATTTTTCTTATGAAAACGACGGCGTTTTGCATTTCTCAACGCTCAGTAACGCCGACGAAACGGAA	560
	M C I D D D F S Y E N D G V L H F S T L S N A D E T E	175
<i>Gm4CL1</i>	GCCCCTGCCGTTAAGATTAACCCTGACGAGCTCGTTGCGCTTCCGTTTTCTTCTGGCACGTCTGGGCTCCCCAAGGGCGT	640
	A P A V K I N P D E L V A L P F S S G T S G L P K G V	202
<i>Gm4CL1</i>	TATGTTATCGCATAAAAACCTGGTCAACCACGATAGCGCAGTTAGTTGACGGCGAAAACCCGCACCAATACACTCACAGCG	720
	M L S H K N L V T T I A Q L V D G E N P H Q Y T H S	228
<i>Gm4CL1</i>	AGGATGTGCTACTCTGTGTGTTGCCTATGTTTCATATCTATGCGCTCAATTCATTTTGCTCTGCGGGATTTCGTTCCGGT	800
	E D V L L C V L P M F H I Y A L N S I L L C G I R S G	255
<i>Gm4CL1</i>	GCGGCCGTGCTTATTTTGCAGAAGTTTGAGATCACTACTCTGTTGGAGCTCATCGAGAAGTACAAGGTGACGGTTGCGTC	880
	A A V L I L Q K F E I T T L L E L I E K Y K V T V A S	282
<i>Gm4CL1</i>	GTTTGTGCCGCCATCGTTTTGGCGTTGGTTAAGAGCGGAGACTCATCGCTACGACCTGTCGTCATTTCGCGCTGTGG	960
	F V P P I V L A L V K S G E T H R Y D L S S I R A V	308
<i>Gm4CL1</i>	TCACCGCGCGGCACCCTTAGGAGGGGAACCTCAAGAAGCCGTTAAGGCTAGGCTACCACACGCTACTTTTGACAGGGA	1040
	V T G A A P L G G E L Q E A V K A R L P H A T F G Q G	335
<i>Gm4CL1</i>	TATGGGATGACAGAAGCAGGACCACTTGCCATTAGCATGGCATTGCAAAAGTACCCTCTAAGATTAAACCAGGTGCATG	1120
	Y G M T E A G P L A I S M A F A K V P S K I K P G A C	362
<i>Gm4CL1</i>	CGGAACCGTTGTGAGAAACGCCGAGATGAAAATCGTGGATACAGAACGGGTGATTCACTTCCAAGAAACAACACGGTG	1200
	G T V V R N A E M K I V D T E T G D S L P R N K H G	388
<i>Gm4CL1</i>	AAATTTGCATAATAGGCACAAGGTCATGAAAGGATATCTAAATGACCCAGAGGCTACAGAGAGAACTGTAGACAAAGAA	1280
	E I C I I G T K V M K G Y L N D P E A T E R T V D K E	415
	Peptid-S1	
<i>Gm4CL1</i>	GGATGGTTACACACAGGAGATATTGGTTTCATTGATGATGATGATGAACCTTCATTGTTGATCGGTTAAAGGAATTGAT	1360
	G W L H T G D I G F I D D D D E L F I V D R L K E L I	442
<i>Gm4CL1</i>	CAAATACAAAGGATCCAAAGTGGCTCCTGCTGAGCTTGAAGCATTGTTGATTGCCACCCAAACATTTCTGATGCTGCCG	1440
	K Y K G F Q V A P A E L E A L L I A H P N I S D A A	468
<i>Gm4CL1</i>	TTGTAGGCATGAAAGATGAAGCTGCAGGGGAAATTCAGTTGCATTTGTTGTAAGGTCAAATGGTTCTGAGATAGCCGAG	1520
	V V G M K D E A A G E I P V A F V V R S N G S E I A E	495

```

Gm4CL1  GATGAAATCAAGAAATACATTTTCAACAGGTGGTTTTTTTACAAGAGAATATGTAGAGTTTTTCTTACGGACTCTATTCC 1600
          D E I K K Y I S Q Q V V F Y K R I C R V F F T D S I P 522

Gm4CL1  TAAAGCACCTCAGGCAAATTTCTGCGAAAGGTATTAAGTCAAGACTTAACGAAGGTTGGTGGTGGCCAATTAGGTCC 1680
          K A P S G K I L R K V L T A R L N E G L V V A N * 546

Gm4CL1  ATAATTGTGACAGAGGAAAATCGTGGCTGTTTTACTTACCGTACCACAGGCCCTTCCTGTTGTGGTTTTTGTCCAATTT 1760

Gm4CL1  TATATCTCGTTATCAATATATATATATAATATGCAAGTATTGCATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1825

```

Abb. 28: Nukleotidsequenz der *Gm4CL1*-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz.

Die Lage des N-terminalen Peptids und der beiden internen Peptide S1 und S2 ist hellgrau markiert. Das mittels 5'-RACE-Methode amplifizierte 5'-Enden der *Gm4CL1*-Nukleotidsequenz ist unterstrichen dargestellt, wobei der ergänzte 5'-Bereich dunkelgrau unterlegt ist. Die dazu verwendeten Oligonukleotidprimer 4CL1-GSP1 und 4CL1-GSP2 sind schwarz markiert. Das 5'-RACE-Produkt und die aus der cDNA-Bank isolierte *Gm4CL1*-Teilsequenz wurden über eine gemeinsame *SalI*-Restriktionsschnittstelle (Box) verknüpft. Das Stopcodon der Nukleotidsequenz ist mit einem Stern gekennzeichnet.

A3: Nukleotidsequenz der *Gm4CL4*-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz

<i>Gm4CL4</i>	<u>ACACCACACACGTAACACATTCAGACACCACCATGATAACTCTAGCTCCTTCTCTTGATACTCCAAAACTGATCAAAA</u>	80
	M I T L A P S L D T P K T D Q N	16
<i>Gm4CL4</i>	<u>CCAAGTTTCTGATCCCCAACTAGCCATGTCTTCAAATCAAATTACCAGATATCCCAATCTCCAACCACCTCCCTCTCC</u>	160
	Q V S D P Q T S H V F K S K L P D I P I S N H L P L	42
<i>Gm4CL4</i>	<u>ACTCCTACTGCTTCCAGAACCTCTCCCAATTGCCCCACCGCCTTGCCCTCATCGTCGGACCCGCCTCCAAAACTTCACC</u>	240
	H S Y C F Q N L S Q F A H R P C L I V G P A S K T F T	769
<i>Gm4CL4</i>	<u>TACGCCGACACCCACCTCATTTCCAGCAAGATCGCCCGCGGATTGTCCAACCTCGGAATCCTCAAGGGCGACGTCGTCAT</u>	320
	Y A D T H L I S S K I A A G L S N L G I L K G D V V M	796
<i>Gm4CL4</i>	<u>GATCCTCCTCCAGAACTCCGCCGATTTGCTCTTCTCCTTCCTCGCCATCTCCATGATTGGCGCCGTGCCACCACCGCCA</u>	400
	I L L Q N S A D F V F S F L A I S M I G A V A T T A	122
<i>Gm4CL4</i>	<u>ACCCGTTCTACACCGCCCCGGAGATCTTCAAGCAGTTCACCGTCTCCAAG</u> GCGAAGTTGATCATAACACAGGCAATGTAC	480
	N P F Y T A P E I F K Q F T V S K A K L I I T Q A M Y	149
<i>Gm4CL4</i>	GTGGACAAGCTCCGCAACCACGACGCGCGAAGCTCGGCGAGGACTTCAAGTTCGTAACC <u>ETCGAC</u> GATCCGCCGGAGAA	560
	V D K L R N H D G A K L G E D F K V V T V D D P P E N	176
<i>Gm4CL4</i>	TTGCCTCCACTTCTCTGTCCTCTCGGAGGCGAACGAGAGCGACGTGCCAGAGGTGGAGATCCACCCGGACGACGCGGTGG	640
	C L H F S V L S E A N E S D V P E V E I H P D D A V	202
<i>Gm4CL4</i>	CGATGCCGTTCTCCTCCGGCAGCAGGGTTTACCTAAAGGAGTGATTCTCACGCACAAGAGTTTAAACCACGAGTGTGGCG	720
	A M P F S S G T T G L P K G V I L T H K S L T T S V A	229
<i>Gm4CL4</i>	CAGCAAGTTGACGGAGAGAACCCTAACCTTACCTCACCACCGAGGAC <u>GTGCTCCTCTGCGTGTTCCEGCT</u> TTTCACAT	800
	Q Q V D G E N P N L Y L T T E D V L L C V L P L F H I	256
<i>Gm4CL4</i>	ATTCTCGCTCAACAGTGTGCTATTGTGCGCCTCAGGGCGGGAGTGCAGTTTTGTGATGCAGAAGTTCGAGATCGGGA	880
	F S L N S V L L C A L R A G S A V L L M Q K F E I G	282
<i>Gm4CL4</i>	CACTGCTGGAGCTGATACAGCGGCACCGAGTGTGCGGTGGCGATGGTGGTGCCTCCCGCTGGTGTGGCGTTGGCAAAGAAT	960
	T L L E L I Q R H R V S V A M V V P P L V L A L A K N	309
<i>Gm4CL4</i>	CCGATGGTGGCGGATTTTGACCTGAGTTCAATACGGTTAGTGTGTCGGAGCTGTCCCTTGGGGAAGGAGCTC <u>GAGGA</u>	1040
	P M V A D F D L S S I R L V L S G A A P L G K E L E E	336
<i>Gm4CL4</i>	<u>GGCTCTCCGGAACA</u> GGATGCCTCAAGCTGTTTTGGGACAGGTTACGGGATGACAGAAGCAGGGCCAGTGTGTCCATGT	1120
	A L R N R M P Q A V L G Q G Y G M T E A G P V L S M	362
<i>Gm4CL4</i>	GCTTGGGCTTTGCAAAGCAACCTTTCCAAACAAAATCAGGCTCTTGTGGTACCGTAGTCAGAAATGCAGAACTCAAGGTT	1200
	C L G F A K Q P F Q T K S G S C G T V V R N A E L K V	389
<i>Gm4CL4</i>	GTTGACCCTGAAACTGGTCGTTCTCTTGGCTACAATCAACCCGGTAAATTTGCATCCGAGGGCAACAGATCATGAAAGG	1280
	V D P E T G R S L G Y N Q P G E I C I R G Q Q I M K G	416
<i>Gm4CL4</i>	ATATCTGAACGATGAGGCAGCGACAGCATCGACCATAGATTAGAGGGTTGGCTTCACACCGGTGATGTTGGCTACGTTAG	1360
	Y L N D E A A T A S T I D S E G W L H T G D V G Y V	442
<i>Gm4CL4</i>	ATGATGATGACGAAATTTTCATTGTTGACAGGGTGAAGGAACTCATCAAATATAAAGGCTTCCAGGTGCCCCCTGCAGAA	1440
	D D D D E I F I V D R V K E L I K Y K G F Q V P P A E	469
<i>Gm4CL4</i>	CTTGAAGGGCTTCTTGTAAGCCATCCCTCCATTGCAGATGCAGCTGTTGTCCACAAAAGGATGTTGCTGCTGGTGAAGT	1520
	L E G L L V S H P S I A D A A V V P Q K D V A A G E V	496

```
Gm4CL4 TCCTGTTGCCTTCGTTGTGAGATCAAACGGCTTTGATCTAACTGAAGAGGCTGTAAAAGAGTTTATAGCTAAACAGGTAG 1600
      P V A F V V R S N G F D L T E E A V K E F I A K Q V 522

Gm4CL4 TGTTTTACAAAAGACTGCACAAAGTTTATTTTGTTCATGCTATTCCTCAAGTCTCCATCAGGAAAGATATTAAGGAAAGAC 1680
      V F Y K R L H K V Y F V H A I P K S P S G K I L R K D 549

Gm4CL4 CTCAGAGCAAAGCTAGAAACCGCCGCCACTCAGACGCCTTAAAGGCTAGCTAGAACCTGCCCCCTTTTTTCTTGCAATA 1760
      L R A K L E T A A T Q T P * 562

Gm4CL4 TTTTCCTTATTTTTTATTTATATTATTGGTTTCACACGTGTAATTTACGTATCAATGCTTCACGGCATTAGCCAATCCG 1840

Gm4CL4 AGAAGCAGTTGCACTTACGTATAATCATTGTATTTTTATGTCCATTGTCCACCACCATGTCTGTATTGTGGTTTTAGATC 1920

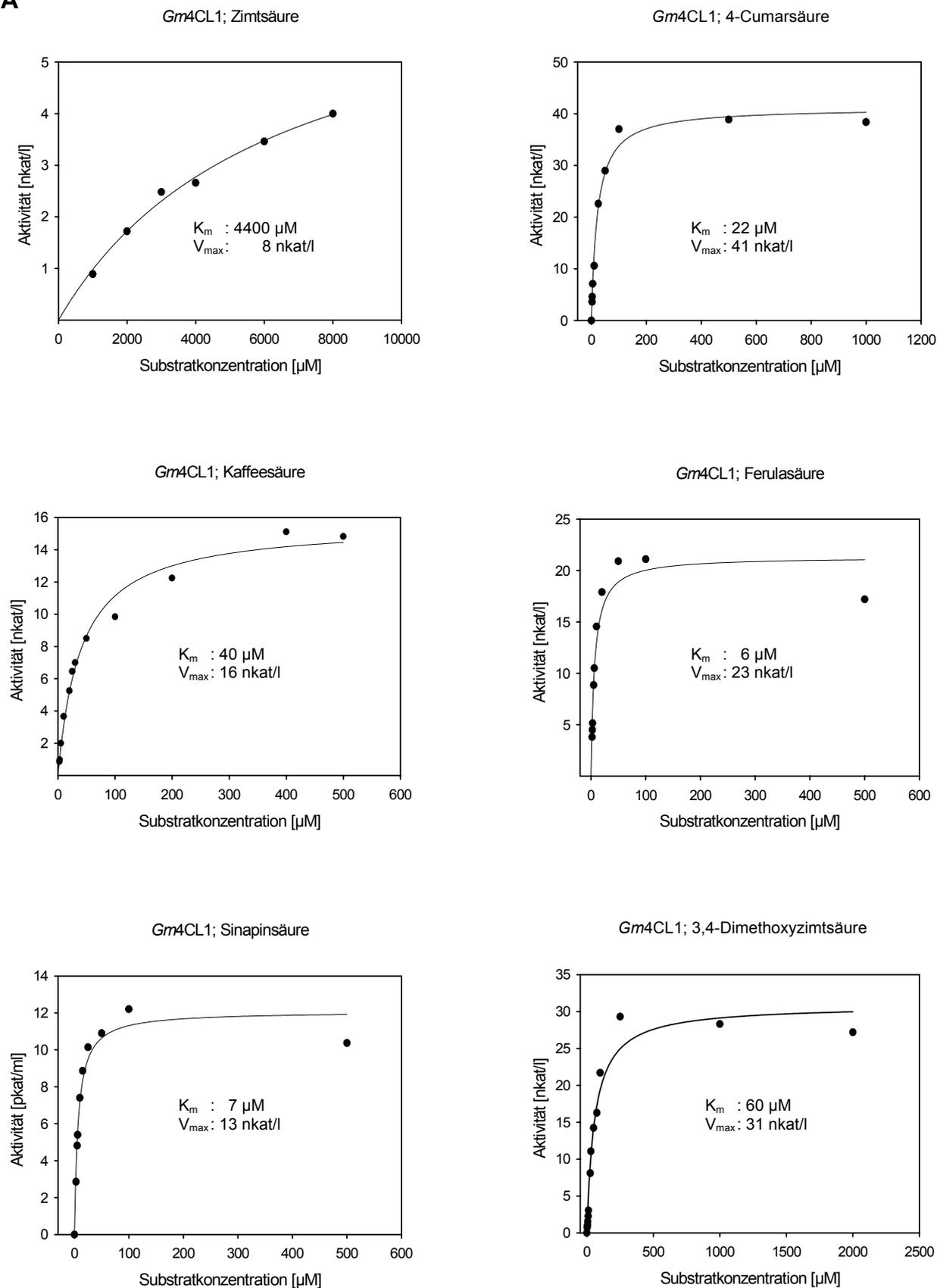
Gm4CL4 ACTAATTTTCGAGACCTTGTA 1941
```

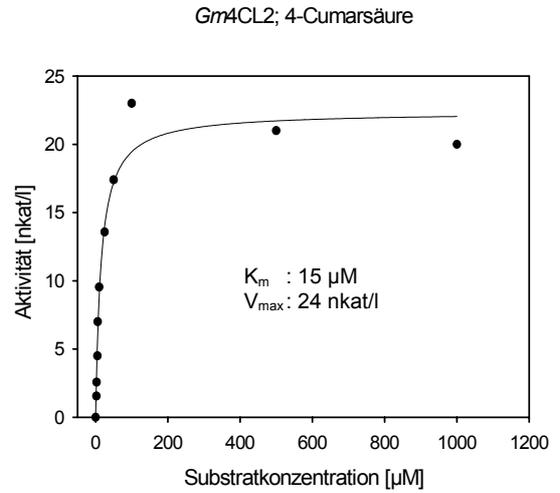
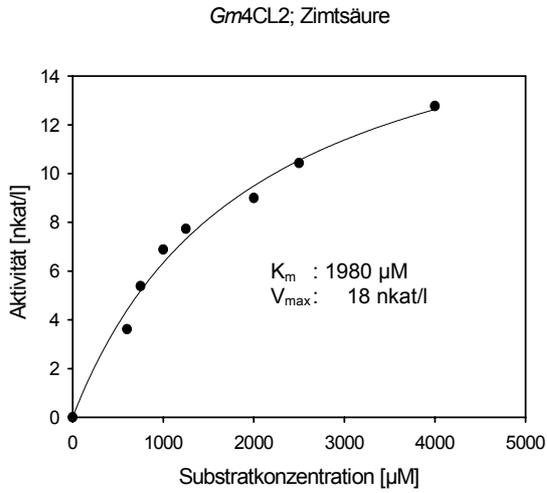
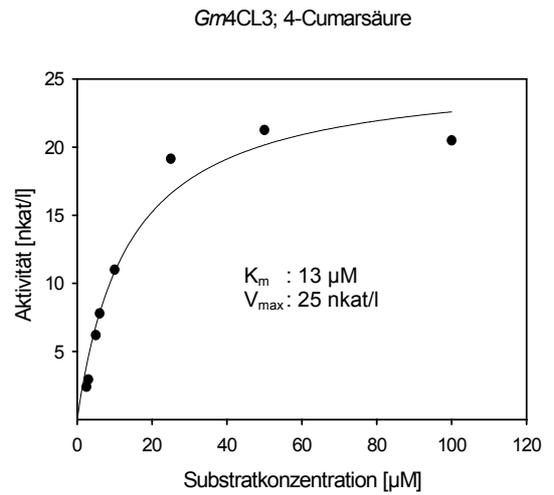
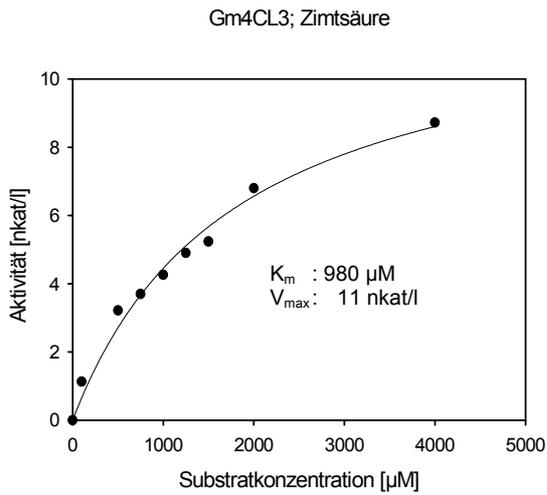
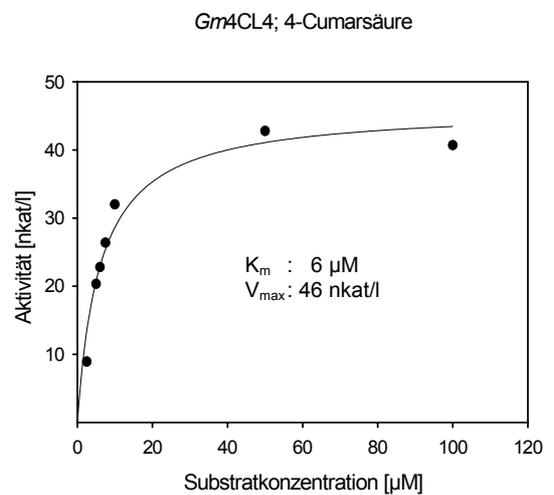
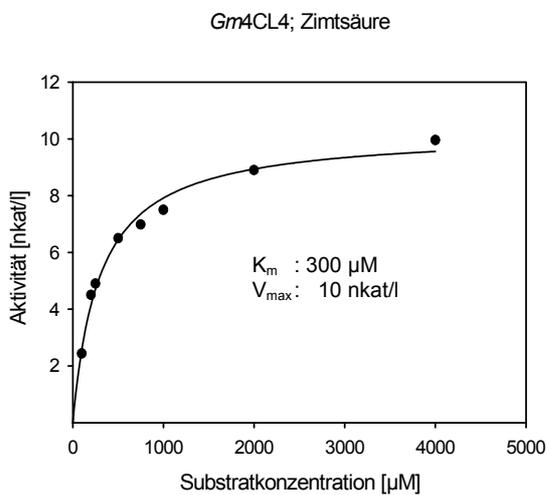
Abb. 29: Nukleotidsequenz der *Gm4CL4*-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz.

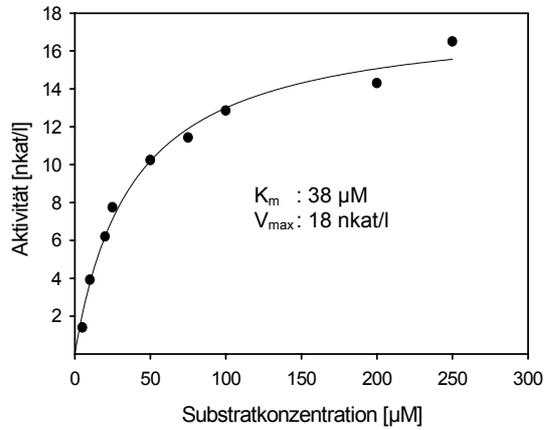
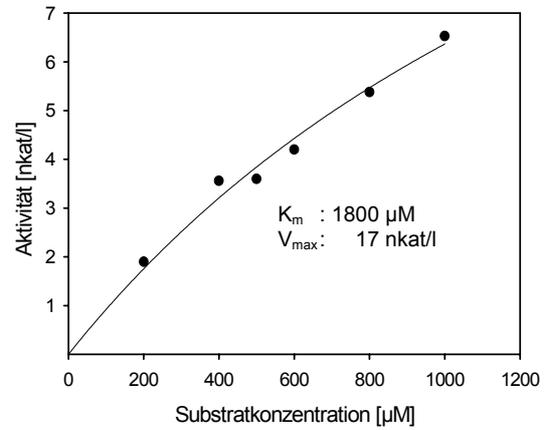
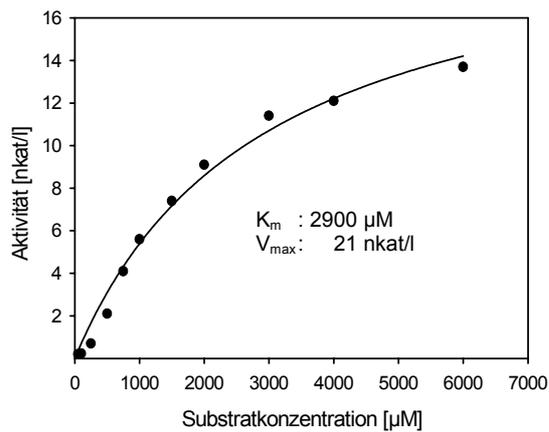
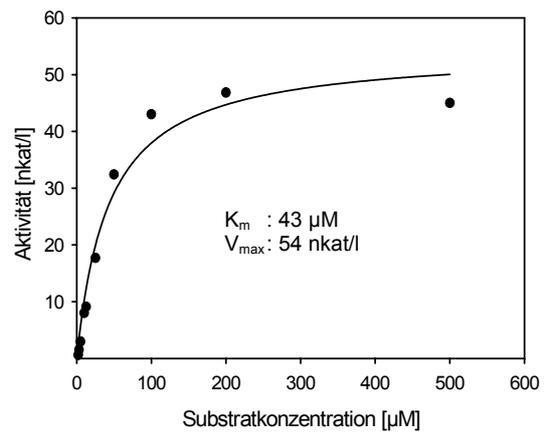
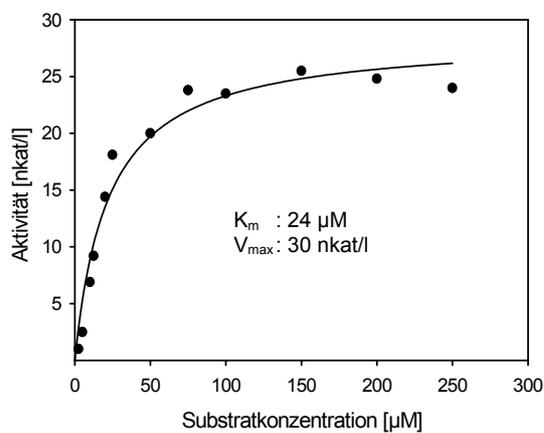
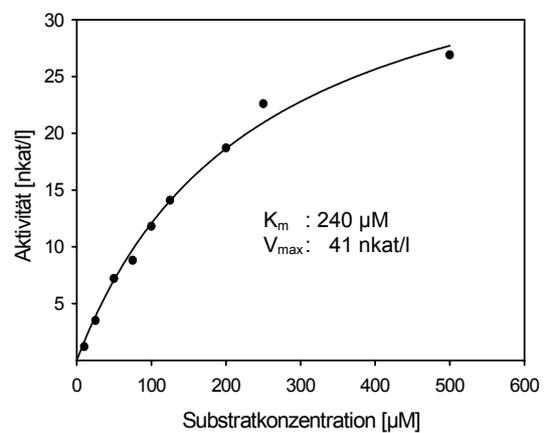
Das mittels 5'-RACE-Methode amplifizierte 5'-Enden der *Gm4CL4*-Nukleotidsequenz ist unterstrichen, wobei der bisher fehlende 5'-Bereich grau unterlegt ist. Die dazu verwendeten Oligonukleotidprimer 4CL16-GSP1 und 4CL16-GSP2 sind schwarz markiert. Das 5'-RACE-Produkt und die von Uhlmann und Ebel (1993) isolierte *Gm4CL4*-Teilsequenz (*Gm4CL16*) wurden über eine gemeinsame *SalI*-Restriktionsschnittstelle (Box) verknüpft. Das Stopcodon der Nukleotidsequenz ist mit einem Stern gekennzeichnet.

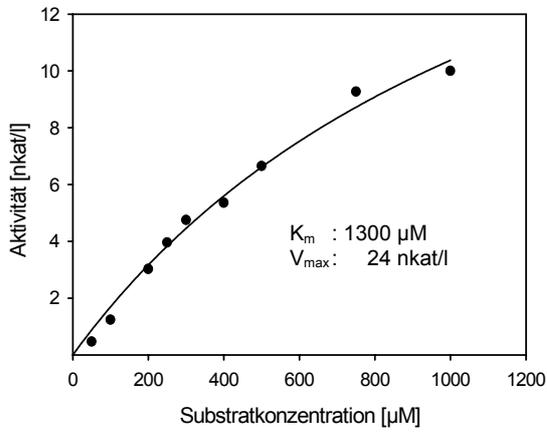
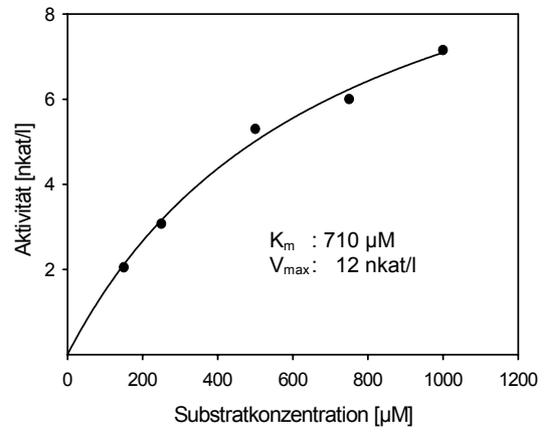
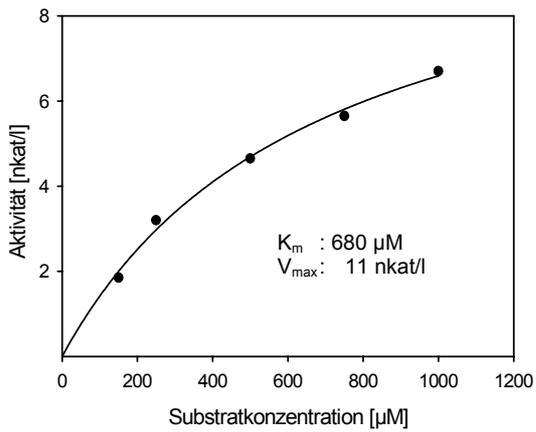
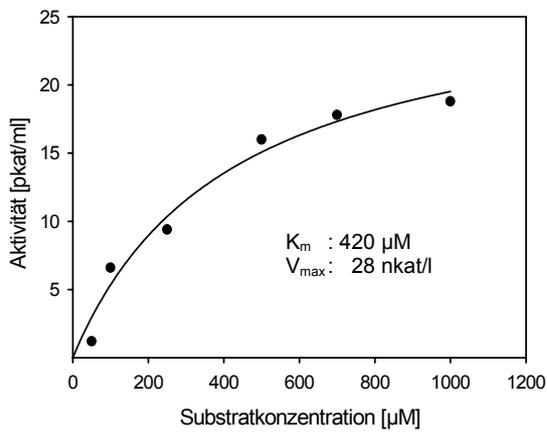
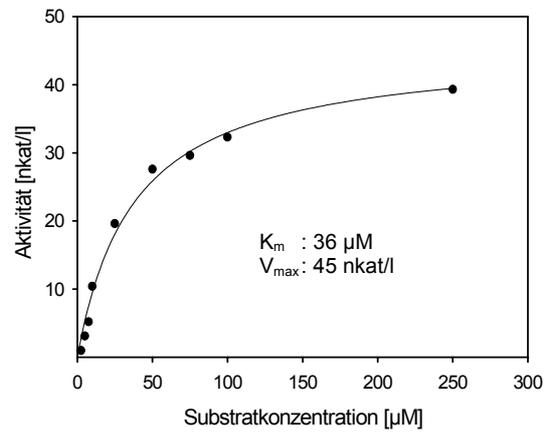
A5: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der *Gm4CL*-Isoformen von der Konzentration verschiedener Zimtsäurederivate

A



B**C****D**

Gm4CL4; Kaffeesäure*Gm4CL4*; Ferulasäure**F***Gm4CL2dv345*; Zimtsäure*Gm4CL2dv345*; 4-Cumarsäure*Gm4CL2dv345*; Kaffeesäure*Gm4CL2dv345*; Ferulasäure

Gm4CL3dV367; Sinapinsäure*Gm4CL2dV345G318Q321*; Sinapinsäure*Gm4CL2dV345Q321*; Sinapinsäure**F***Gm4CL3dV367*; Zimtsäure*Gm4CL3dV367*; 4-Cumarsäure

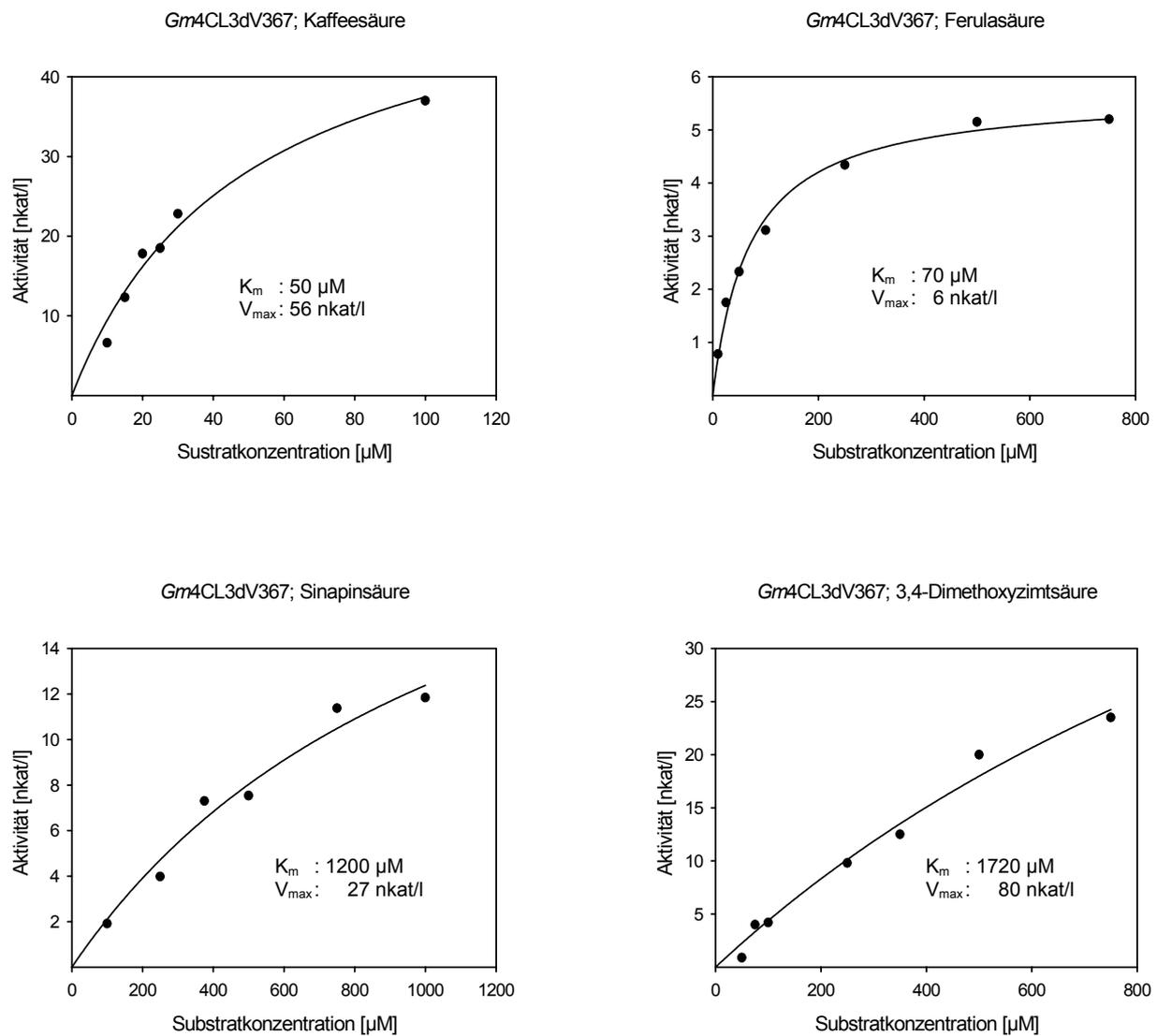


Abb. 31: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration verschiedener Zimtsäurederivate für die rekombinanten *Gm4CL1* (A), *Gm4CL2* (B), *Gm4CL3* (C), *Gm4CL4* (D) *Gm4CL2dV345* (E) und *Gm4CL3dV367* (F) nach direkter Auftragung der Meßpunkte.

Für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten der rekombinanten 4CL-Isoformen wurde jeweils bakterieller Rohextrakt im spektralphotometrischen Test eingesetzt. Die K_m - und V_{max} -Werte wurden mit Hilfe der Regressionsgleichung für rechtwinklige Hyperbeln ermittelt. Jeder Meßpunkt stellt einen Mittelwert aus mindestens drei Messungen dar. Zur Berechnung der rel. V_{max} -Werte dienten die angegebenen V_{max} -Werte der verschiedenen Isoenzyme für 4-Cumarsäure als Bezugsgröße (100%).

Ausnahmen: Die K_m -Werte der *Gm4CL1*, *Gm4CL4* und *Gm4CL3dV367* wurden für die verschiedenen Zimtsäurederivate mit unterschiedlichen Extrakten bestimmt. Da die Isoenzyme gegenüber 4-Cumarsäure sehr niedrige K_m -Werte besitzen ($< 40 \mu\text{M}$) wurde zur Berechnung der rel. V_{max} -Werte für jeden Extrakt die Aktivität mit $500 \mu\text{M}$ 4-Cumarsäure als V_{max} -Wert für 4-Cumarsäure verwendet. Die verschiedenen Extrakte zeigten folgende Aktivitäten mit $500 \mu\text{M}$ 4-Cumarsäure: Extrakt zu Bestimmung der kinetischen Daten der *Gm4CL1* für Zimtsäure: 100 nkat/l . Extrakt zu Bestimmung der kinetischen Daten der *Gm4CL4* für Kaffeesäure: 37 nkat/l . Extrakt zu Bestimmung der kinetischen Daten der *Gm4CL2dV345G318Q321* für Sinapinsäure: 53 nkat/l . Extrakt zu Bestimmung der kinetischen Daten der *Gm4CL2dV345Q321* für Sinapinsäure: 52 nkat/l . Extrakt zu Bestimmung der kinetischen Daten der *Gm4CL3dV367* für Zimtsäure und Kaffeesäure: 90 nkat/l . Extrakt zu Bestimmung der kinetischen Daten der *Gm4CL3dV367* für Sinapinsäure: 265 nkat/l .

A7: Vergleich von Aminosäuresequenzen einiger Adenylat-bindender Enzyme

```

Gm4CL1 -----MAP--SQEIIFRSPLPD--IPIPTHLPLYSYCFQNLRSQFHDR--PCLID 44
Gm4CL2 -----MADDGSRRELIIFRSKLPD--IYIPKHMPLHSYCFENLRECGSR--PCLIN 46
Gm4CL3 -----MTTVAASLDAKEVSTSKTDQNVQCDQDPQTSVHFVSKLPLD--IPISNHLPLHAYCFQKLSQFSDR--PCLIV 68
BbPheA -----MVNSSKSIILHAQNKNGTHEEEQYLFVANNTKAEYPRDKTIHQLFEEQVSKRFNN--VAIVC 60
PpLuc -----MED----AKNIKKGPAPF--YPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTD 44
Ps4CbL -----MQTVNELLRRAATRAPDH--CALAD 23
BsAS -----MSELIHCTIGRLLLEQTAAYYDQ--EAVVY 28
BsAL -----MNLKALPAIEGDHNLKNEYEYTRHFDWAEAEKHFVWHETGKLNAAEYAIIDRHAESFRKNKVALYK 67
DrAL MDPALLTTPVSPDALKKTPAPVTPERAQQLRDMPPAGDYWLSVASELTWDVPPPTALEGTFGDFQYFPGAKGNVSVNCLD 80
PcPhaL -----MVFLP---PKESGQLDPIPDNIPISEFMLNERYGRVRHASSRDP--YTCGIT 47
ScPCS -----MTSAATVTASFNDTFSVSDN--VAIVV 25

```

```

Gm4CL1 GDTGETLTYA-----DVDLAARRIASGLHKI-----GIRQGDVIMLVLNRNCPQFALAFLGATHRGAVVTT 104
Gm4CL2 APTGDVYSYH-----EVDSTARKVARGLKKE-----GVEQGVIMILLPNCPEVFSFGLGASHRGAMATA 106
Gm4CL3 GPAAKTYTYS-----ETHLISRKIAAGLSNL-----GIRKGDVIMILLQNSAEVFSFGLAASMI GAVATT 128
BbPheA E--NEQLTYH-----ELNVKANQLARIFIEK-----GIGKDTLVGIMMEKSIDLFIGILAVLKAGGAYVP 118
PpLuc AHIEVNIITYA-----EYFEMSVRLAEAMKRY-----GLNTNHRIVVCSENSLQFMPVLGALFIGVAVAP 104
Ps4CbL PARGLRLTHA-----ELQTRVEAVARLHAD-----GLRPQQRVAVVAPNSADVVAIALALHRLGAVPAL 83
BsAS PDRNLRITYV-----QFNRLCRQTAKGLMGM-----GIGKGDHVAIWASNIPEWLAQQFATAKIGAVLVT 88
BsAL AKRDEKYTFK-----EMKEESNRAGNVLRRYG-----NVEKGDVRFIFMPRSPELYFIMLGAIKIGAIAGP 128
DrAL RHPKNRVALYIEREDGLKETWSYGDLTDFATRAAALQDL-----GVDKGDVRFVAVIYLSNVPEAFIAIHACYRIGAIYSV 154
PcPhaL GKSYSSEKVAN-----RVDSLARSLSKEFGWAPN---EGSEWDKTLAVFALNTIDSLPLFWAVHRLGGVLT 111
ScPCS PETDQTQVYR-----DLSHMVGHFQTMFTNPNSPLYGAVFRQDVAISMRNGLEFIVAFGLGATMDAKIGAP 91

```

+ + + *

```

Gm4CL1 ANPFYTPAELAKQATATKTRLVITQSAY-----VEKIKSFAD---SSS-DVMVMCIDDDFSYEND--G-VLHF 165
Gm4CL2 ANPFFTPAEIAKQAHASNAKLLITQASY-----YDKVKDLR-----DIKLVFVDSPPHTEE--KQHLHF 164
Gm4CL3 ANPFYTAEIFKQFTVSKAKLIITQAMY-----VDKLRNHDDGAKLGE--DFKVVTVDDPEN-----CLHF 188
BbPheA IDIEYPKERIQYILDDSQARMLLTQKHL-----VHLIHNIIQ-----FNGQVEIFEEDT-----IKIR 170
PpLuc ANDIYNRELLNSMNISQPTVVVFSKKG-----LQKILNVQKKLPITQ--KIIIMDSKTDYQGFQS--MYTFVT 169
Ps4CbL LNPRLKSAELAEILKRGEMAAAVIAGVQ-----QVADTIFQ---SGS-RAQIIFGLDLVRDG-E--PCDSYG 143
BsAS VNTNYQSQELDYLLRQSDADALIVMNSYRGTSYTEILNSLIPELKEAEPGLQSE--RYPCLKTLIYIGEKRL--PGMYHW 165
BsAL LFEAFMEGAVKDRLENSEAKVVVTTPEL-----LERIPVDK---LPH-LQHVFFVVGGEAESGTN---IINYD 188
DrAL IFAGFSASAVRDLRLDQPKVVVCTDGLRGRN---IPLKATLDEALEGLEKPTVIVARRLDPLPLGEN---ELDFA 227
PcPhaL ANASYSAAELTHQLLDSKAKALVTCVPL-----LSISLEAAAKAGLPKNRIYLLDVPQLLGGVVK--PPAGYK 177
ScPCS LNPNYKEFNFYLNLDLKSKAICVPGKGTKLQSSSE---ILKSASTFGCFIVELAFDATRFRVEYDIYS PEDNYKRVIYR 167

```

+ + +

```

Gm4CL1 STLS--NADETEAPAVKINP-----DELVALPFSGTTGLPKGVMLSHKLNLTIAQLVDGE-----NPHQYTHSEDL 232
Gm4CL2 SHLCEDNGDADVDVDVVDIKP-----DDVVALPFSGTTGLPKGVMLSHKGLVTSIAQQVDGD-----NPNLYYHCHDTI 233
Gm4CL3 SVLS--EANESDAPEVDIQP-----DDAVAMPFSGTTGLPKGVVLTHTKSLTTSVAQQVDGE-----NPNLYLTEDVL 255
BbPheA EGTN-----LHVPSKSTDL-----AYVIYTSGTTGNPKGTMLEHKGISNLKVVFFENSL-----NVTEKDRI 226
PpLuc SHLPP-GFNEYDFVPESFDR-----DKTIALIMNSGSGTGLPKGVLPHTACVRFSHARDPI-----FGNQIIP-DTAI 237
Ps4CbL PPIE-----DPQREPAQP-----AFIFYTSGTTGLPKAAIIPQRAAESRVLFMSTQV-----GLRHGQHNVV 200
BsAS DDEMLAQSVSDAELEARMSSEK---DDVINMQYTSGTTGFPKGVMLTHFNVINNAANNAECM-----KLTSSDRM 234
BsAL EAAK---QESTRLDIEWMDK-----KDGFLLYTSGSGTGTGPKGVMLVHVEAMIQQYQYQTKVWL-----DLKEEDIY 250
DrAL ELLEKTRRAAPVSLDANDP-----GFIYTSGTTGSKPKGLVHSGIGFLTGTIANVKWA-----LNLQPDVY 290
PcPhaL SVSELTQAGKSLPPVDELRSWAGEGARRTAFVCSGTTGLPKGVMIHRNVIANTLQIKAFEQNYRDGGGKTPASTEVA 257
ScPCS SLNNAKVFVNTNPVKFPGFAR-----SSVALIHLTSGTTSTPKTVPLHLNIVRSTLNIAANTY-----KLTPLDRS 233

```

+ +***+ **

```

Gm4CL1 LCVLPMFHLYALNS---ILLCGIRSGAA-VLILQKFEITT---LLELIEKYKVTVASFVPPIVLALVKSG--ETHRYDLS 303
Gm4CL2 LCVLPLFHYSLNS---VLLCGLRAKAT-ILLMPKFDINS---LLALIHKKHKTIVAPVPPIVLAIKSKP--DLHKYDLS 304
Gm4CL3 LCVLPLFHFISLNS---VLLCALRAGSA-VLLMQKFEIGT---LLELIQRHRVSVAMVPPPLVLAALAKNP--MVADFDS 326
BbPheA GQFASISFDASVWE---MFMALLTGASLYIILKDTINDFVK---FEQYINQKEITVITLPPYTVVHLDPER-----IL 293
PpLuc LSVVFFHHGFGMFTTLGYLICGFR-----VVLMYRFEEL---FLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKST--LIDKYDLS 307
Ps4CbL LGLMPLYHVVGFEFA---VLVAALALDGT-CVVVEEFRPVD---ALQLVQELVTSLEFATPHTLDALAAAAAQAGSSKLK 273
BsAS CIPVFFHCFGCVLG---VLACVSVG-AA-MVPVVEFEPAT---VLTTVENETCTALHGVPMTMFIQLHLQ--DFDSYDLS 305
BsAL WCTADPGWVTGIVYG--IFAPWLNAGATN-VIVGGRFSPES---WYGTIEQLGVNVWYSAPTAFRMLMGAGDEMAAKYD 324
DrAL WCTADVGLTFFIF---ALVGGLAHGAHVYIEGSDTPTPERPYQIERYRADKVFETAPTALRMLRRSGDEALARYDLS 367
PcPhaL LGLLPQSHLYALVV---IGHAGAYRGDQ-TIVLPKFELKS---YLNAIQQYKISALFVPPITIIHMLGTQD-VCSKYDLS 329
ScPCS YVVMPLFHYHGLIS---VLLSTFRQTQS-VVVVDGFHFKL---FWDQFVKYNCNWFSCVPTISIMILNMP----KNPFP 302

```

+ + *

<i>Gm4CL1</i>	SIRAVVTCGAPLGGELQEAVKARLP--HATFGQGYGMTEAGP--LAISMAFAKVPKIKPGACGTVVRNAEMKIVDTETGD	380
<i>Gm4CL2</i>	SIRVLKSGGAPLKGLEEDTLRAKFP--NAKLGQGYGMTEAGPVLTMSLAFAKEPIDVKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGH	382
<i>Gm4CL3</i>	SIRLVLSGAPLKGELVEALNRVFP--QAVLGGQGYGMTEAGPVLMSCLGFAKQPFPTKSGSCGTVVRNAELRVDPETGR	404
<i>BbPheA</i>	SIQTLIAGSATSPSLVNKWKEKV---TYIN--AYGPTETTCATTWVATKETI--GHSVPIGAPIQNTQIYIVD-ENLQ	365
<i>PpLuc</i>	NLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFH--LPGIRQGYGLTEFTSALLITP-----EGDDKPGAVGVVPPFEAKVVDLDTGK	380
<i>Ps4CbL</i>	SLRHITFAGATMPDAVLEAVHQHLP--GEKVN--IYGTTEAMNSLYMRQP-----KTGTEMVPGFFSEVRIVRVGGGVDE	344
<i>BsAS</i>	SLRTGIMAGSSCPSEVMKAVIEKMG--MTDITIAYGDTPEPSVLTQTRA--NDSFQRRVETTGRALPEVEVKIVEPGTFN	381
<i>BsAL</i>	SLRHVLSVGEPLNPEVIRWGHKVF---NKRIHDTWMMTEFTGSQLICNYPCMDI---KPGSMGKPIPGVEAAIVD-NQGN	396
<i>DrAL</i>	PLQLVALVGEPLDPETWHWTHDVLGGGRLFVNNYTGDTETGTANASSMVLTE---GRPGSCGHPLPGYRAAVVH-EDGT	443
<i>PcPhaL</i>	SVTSLFTGAPLGMETAADFLLKLYP--NILIRQGYGLTEFTCTVVSSTHPHDIWL-----GSSGALLPGVEARIVTPENKE	402
<i>ScPCS</i>	HIRFIRSGSSALAPATFHKLEKEF---NAPVLEAYAMTEASHQMTSNLPP---GKRKPGTVGQP-QGVTVVILD-DNDN	374
	+ + + * ** * +*	
<i>Gm4CL1</i>	SLPRNKHGEICIRG--TKVMKGYLNDPEATERTVD-----KEGWLHTGDIIGFIDDD---DELFTVDRLKELIKYKGFQ	448
<i>Gm4CL2</i>	SLPRNQSGEICIRG--DQIMKGYLNDGEATERTID-----KDGWLHTGDIIGYIDDD---DELFTVDRLKELIKYKGFQ	450
<i>Gm4CL3</i>	SLGYNQSGEICIRG--QQIMKGYLNDKATALTID-----SEGWLHTGDIIGYVDEDD---DELFTVDRVAKELIKYKGFQ	472
<i>BbPheA</i>	LKSVGEAGELCIGG--EGLARGYWKRPELTSQKFDVDPFVPEKLYKTGDQARWLSD---GNIEYLGRIDNQVKIRGHR	439
<i>PpLuc</i>	TLGVNQRGELCVRG--PMIMSGYVNNPEATNALID-----KDGWLHSGDIAYWDED---EHFFIVDRLKSILIKYKGYQ	448
<i>Ps4CbL</i>	VMANGEEGELIVAAS-DSAFVGYLNPQATAEKL-----QDGWYRTSDAAVWTPE---GTVRELGRVDDMIISGGEN	412
<i>BsAS</i>	EVQRGVQELCTRG--YHVMKGYKDEEATQKAIN-----PEGWLFTGDLAVMDED---GYCRVTRGLKMDLIRGGEN	449
<i>BsAL</i>	ELPPYRMGNLAIKKGWPSMMHTIWNNEKYESYFM-----PGGWVYSGDSAYMDEE---GYFWFOGRVDDVIMTSGER	466
<i>DrAL</i>	PCGFNELGSLTLTEPFPCARTVWGDHRYVETYSLS---EFPGKYAADAALLDSD---GQLWVTRGLRDDVMNVAGHR	515
<i>PcPhaL</i>	ITTYDSPGELVVRG--PSVVLGYLNNEKATAETF-----VDGWMRTGDEAVIRRSKPGIEHVFTVDRIKELIKVKGLQ	473
<i>ScPCS</i>	VLPFGKVEVSIRG--ENVTLGYANNPKANKENFT-----KRENYFRTCDDGYFDPE---GFLVLETRIKELINRGGKEK	443
	* + + + + * + * + * + * + *	
<i>Gm4CL1</i>	VAPAELEALLIAHPNISDAAVVMKDEAAGEIPVAFVVRNSG-----SEIAEDEIKKYISQ-QVVFYKRICR-VFFTDS	520
<i>Gm4CL2</i>	VAPAELEALLTHPKISDAAVVPMKDEAAGEVPAFVVISNGY-----TDTTEDEIKQFISK-QVVFYKRINR-VFFIDA	523
<i>Gm4CL3</i>	VPAELEGLLVSHPSIADAADVQKDVAAAGEVPAFVVRNSG-----FDLTEEAVKEFLAK-QVVFYKRLHK-VYFVHA	544
<i>BbPheA</i>	VELEEVEISLLKHMYSITAVSVHKDHQEQPYLCAYFVSEKH-----IPLEQLRQFSSE-ELPTYMIPSY-FIQLDK	509
<i>PpLuc</i>	VAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVLEHG-----KTMTEKEIVDYVAS-QVTAKKLRGGVVVDE	521
<i>Ps4CbL</i>	IHPSEIERVLGAAPGVAEVVVIGLADQRWQSVTACVVRPG-----ETLSEDALDAFCRSSELADFKRPRK-YFILDQ	485
<i>BsAS</i>	VYPREIEEFLYRHPNILDVQVGVVDEKYEGEEAAWIKLKEG-----KTASPEELKAYCK-----	504
<i>BsAL</i>	VGPFEVESKLVHEHPAIAEAGVIGKPDPRVGEI IKAFIALREGF---EPSDKLKEEIRLFVKQ-GLAAHAAPRE-IEFKDK	541
<i>DrAL</i>	LGTMEMEALLTHPAVSEAAVVAMPDDIKGAVPVAFVVRPRAGIRLDTDLTWLENELADAVVS-GVGAIARPGR-VVVTPT	593
<i>PcPhaL</i>	VAPAELEAHLAHPDVSDCAVIAIPDDRAGEVPAIVVKSASA---GSDESVSQALVKYVED-HKARHKWLKGGIRFVDA	549
<i>ScPCS</i>	ISPIELDGIMLSHPKIDEAVAFVGPDDMYGQVVQAAIVLKKG-----EKMTYEELVNFLKK-HLASFKIPTK-VYFVDK	515
	+ *** + ** + + * * * * + + +	
<i>Gm4CL1</i>	IPKAPSGKTLRKVLTR-LNEGLVVAN-----	546
<i>Gm4CL2</i>	IPKSPSGKTLRKDLRAK-IAASVPK-----	547
<i>Gm4CL3</i>	IPKSPSGKTLRKDLRAK-LETAATQTP-----	570
<i>BbPheA</i>	MPLTNGKTLDRKQLEPDLTFGMRVDYEAAPRNEIEETLVTIWQDVLGSHHHHHH	563
<i>PpLuc</i>	VPKGLTGLDARKIREI-LIKAKKGGKSK-L-----	550
<i>Ps4CbL</i>	LPKNALNKLRRQLVQQ-VSS-----	505
<i>BsAS</i>	-----GKIADTKFRAI-SSLQTSIL-----	523
<i>BsAL</i>	LPKTRSGKIMRRVLKAW-ELNLPAGDLST-MED-----	572
<i>DrAL</i>	VPRTRSGKIMRRLRDL-LLTGEVKGDLT-SLENPDALETVRELRGGAAAG---	642
<i>PcPhaL</i>	IPKSPSGKTLRRLIRDQ-EKEARRKAGSK-I-----	578
<i>ScPCS</i>	LPKTATGKIQRRVIAET-FAKSSRNKSKL-----	543
	+* **+ + +	

Abb. 33: Vergleich von Aminosäuresequenzen einiger Adenylat-bindender Enzyme.

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm CLUSTAL W 2.0 (Thompson et al., 1994) durchgeführt und per Hand korrigiert.

- : Aminosäuren, die bei PheA die Bindetasche für Phenylalanin bilden
- : Aminosäuren, die bei PheA die Bindetasche für AMP bilden
- : eingefügte Lücken (Gaps), um die Sequenzähnlichkeiten zu maximieren
- * : Aminosäuren, die bei mindestens 85% der Sequenzen identisch sind
- + : Aminosäuren, die bei mindestens 85% der Sequenzen ähnlich sind

Folgende Sequenzen wurden für den Protein Sequenzvergleich verwendet:

Gm4CL1, *Gm4CL2*, *Gm4CL3* (*G. max*, 4-Cumarat:CoA Ligase); *PpLuc* (*Ph. pyralis*, Luciferase); *BbPheA* (*B. brevis*, Gramicidin-S-Synthetase); *Ps4CbL* (*Pseudomonas sp.*, 4-Chlorobenzoyl:CoA Ligase); *PcPhaL* (*Penicillium chrysogenum*, Phenylacetyl:CoA Ligase); *BsAL* (*Bacillus subtilis*, Acetyl:CoA Ligase); *DrAL* (*Deinococcus radiodurans*, Acetyl:CoA Ligase); *BsAS* (*Bacillus subtilis*, Acyl:CoA Synthetase); *ScPCS* (*Saccharomyces cerevisiae*, Peroxisomale CoA-Synthetase)

A8: Mutation im GEICIRG-Motiv

Das GEICIRG-Motiv (Box II, vgl. Abb. 20 Motiv M8) ist innerhalb der 4CLs eine hoch konservierte Peptidsequenz, dessen Cystein eine Beteiligung an der Katalysereaktion zugesprochen wurde (Becker-André et al., 1991). Während der Klonierung der *Gm4CL1*-cDNA hatte sich eine *Gm4CL1*-Mutante ergeben, die in diesem Motiv anstelle des Arginin für ein Isoleucin (R393I) kodierte. Beide Formen wurden in *E. coli* synthetisiert und ihre Substratspezifitäten bestimmt (Abb. 26). Die rekombinanten Enzyme *Gm4CL1/I393* und *Gm4CL1/R393* besaßen identische Substratspezifitäten. K_m - und V_{max} -Werte für die verschiedenen Zimtsäurederivaten wurden nur für *Gm4CL1/I393* bestimmt (Tab. 9).

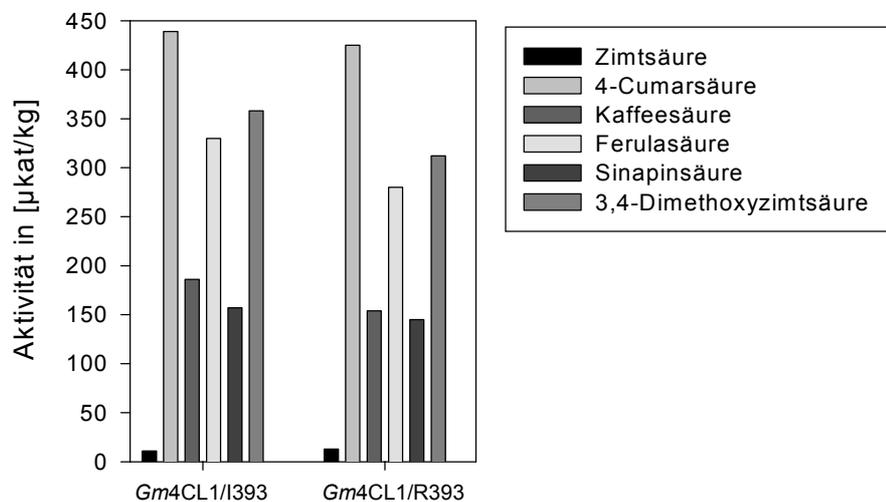


Abb. 34: Vergleich der Substratspezifitäten von *Gm4CL1/I393* und *Gm4CL1/R393*.

Nach der Synthese der *Gm4CL1*-Mutanten im *E. coli*-Stamm SG13009 wurde die 4CL-Aktivität in den bakteriellen Rohextrakten bzgl. Zimtsäure (2000 µM), 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure (je 500 µM) im spektralphotometrischen Test bestimmt.

Danksagung

Prof. Dr. J. Ebel danke ich für die Überlassung des Themas, seine stetige Diskussionsbereitschaft und vor allem für die Freiheit, meinen Interessen folgen zu können.

Bei Prof. Dr. Hugo Scheer möchte ich mich sowohl für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Promotion als auch für die Erstellung des Gutachtens zur Gewährung meines Promotionsstipendiums bedanken.

Mein Dank gilt auch Judith Fliegmann und Axel Mithöfer, die mir bei kleinen und großen Problemen unterstützend zur Seite standen und maßgebend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Besonders bei Judith bedanke ich mich für die Betreuung im Labor und für die Einführung in die unendlichen Weiten der Molekularbiologie. Außerdem danke ich ihr für die Unterstützung bei der Verfassung der Manuskripte und für die Erledigung mancher kleiner (Wochenend-)Jobs (Platten rausnehmen, Kulturen animpfen,...), die sie für eine Tafel Schokolade aber auch gern gemacht hat.

Bedanken möchte ich bei Andrea, Edda, Jens, Luis, Eric, Steffi, Kati, Olu, Ines, Axel und Judith und allen die sonst noch dazu beigetragen haben den Laboralltag so angenehm und oft auch witzig zu gestalten, daß ich mir eine besseres Arbeitsklima nur schwer vorstellen kann. Ich hoffe, daß wir noch einige Spanier-Abende und Hütten-Wochenenden (mit Eric „the Jack‘l“ Cosio) gemeinsam verbringen werden.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Scheer danke ich für die Erlaubnis ihren Sonifier zu verwenden und für die Duldung der Lärmbelästigung, wenn ich das Gerät benutzte (und ich habe es oft benutzt).

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Günther Heubl und Harald Meimberg für die Unterstützung bei der phylogenetischen Sequenzanalyse.

Mein Dank gilt auch Frau Reichinger und Herrn Höck für die große Geduld bei der Gestaltung einiger Abbildungen für meine erste Publikation.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Unterricht, Kultus, Wissenschaft und Kunst danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian Lindermayr
geboren am 02.02.1970 in Friedberg/Bayern
ledig; zwei Kinder

Schulbildung

1976 – 1980

1980 – 1981

1981 – 1990

Grundschule in Derching
Hauptschule in Stätzing
Wernher-von-Braun Gymnasium in Friedberg
Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1990 – 1992

Ausbildung zum Gärtner/Fachrichtung Gemüsebau
im Betrieb von Wilhelm Koch

Hochschulausbildung

1992 – 1998

Studium der Biologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Studienschwerpunkte:
Stoffwechselfysiologie der Pflanzen,
pflanzlicher Sekundärstoffwechsel/Ökologie,
Mikrobiologie, botanische Systematik

Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr. J. Ebel
Fachbereich biochemische Phytopathologie
Thema: Partielle Reinigung und weitere Charakterisierung
eines Isoenzym von 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL)
aus Sojabohne (*Glycine max* L.)

Promotion

seit 1998

Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am botanischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. Dr. J. Ebel
Fachrichtung biochemische Phytopathologie