

Untersuchungen zur Biosynthese
aromatischer Sekundärmetabolite
in Zellkulturen von
Sorbus aucuparia L. und *Centaureum
erythraea* RAFN.



Untersuchungen zur Biosynthese aromatischer
Sekundärmetabolite in Zellkulturen von
Sorbus aucuparia L. und *Centaurium erythraea* RAFN.

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von
Helge Scharnhop
aus Lüneburg

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2008

978-3-86727-665-8

1. Referent: Prof. Dr. Ludger Beerhues

2. Referent: apl. Prof. Dr. Dirk Selmar

eingereicht am: 05.05.2008

mündliche Prüfung (Disputation) am: 25.06.2008

Druckjahr 2008

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig, Fakultät für
Lebenswissenschaften.

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2008

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-665-8

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Scharnhop, Helge. Einblicke in die „BioSynthese“ von Biphenylen im Modellsystem *Sorbus aucuparia* (Vortrag). Kolloquium der Pharmazeutischen Institute, TU Braunschweig, Dezember 2007

Scharnhop, Helge; Beerhues, Ludger. Regulation of 4CL isoforms in *Sorbus aucuparia* cell cultures (Poster). 125 Years Deutsche Botanische Gesellschaft, Botanikertagung, University of Hamburg, September 2007

Scharnhop, Helge; Ramadan, Hussein; Beerhues, Ludger. Cinnamate:CoA ligase involved in benzoic acid metabolism in *Sorbus aucuparia* cell cultures (Poster). Pre-Satellite Meeting for and by Ph.D. Students and Postdoctoral Fellows of the 3rd World Congress of the Board of Pharmaceutical Sciences of FIP (PSWC), Amsterdam, The Netherlands, April 2007

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1	Botanik relevanter Pflanzen	1
1.1	Centaurium erythraea RAFN.	1
1.2	Sorbus aucuparia L.	2
1.3	Rubus idaeus L.	4
1.4	Arabidopsis thaliana L.	4
2	Bedeutung relevanter Sekundärmetabolite	5
2.1	Benzophenone	6
2.2	Xanthone	7
2.3	Biphenyle	8
2.4	Flavonoide	9
2.5	Lignin	11
3	Biosynthese relevanter Sekundärmetabolite	12
3.1	Biosynthese und Aktivierung von Benzoesäuren	12
3.2	Biosynthese von Polyketiden	15
3.3	Biosynthese von Phenylpropanen	17
3.3.1	Biosynthese von Flavonoiden	18
3.3.2	Biosynthese von Lignin	19
4	Zielsetzungen	21
II.	Ergebnisse	23
1	Untersuchung der Biosynthese von 3-Hydroxybenzoesäure in Zellkulturen von Centaurium erythraea	23
1.1	Allgemeines	23
1.2	Zellkulturen	23
1.3	Nachweis von Xanthonen	24
1.4	Detektion von Enzymaktivität	26
1.5	Stabilität von Enzymextrakten	26
2	Klonierung von CoA-Ligasen aus Sorbus aucuparia	28
2.1	Allgemeines	28
2.2	Vergleich von Aminosäuresequenzen	28
2.3	Oligonukleotidsynthese	29
2.4	Gewinnung von CoA-Ligase-cDNA-Fragmenten	29
2.5	Klonierung, Sequenzierung und Datenbankvergleich	29
2.6	Screening von Amplifikationsprodukten	30
2.7	Gewinnung der vollständigen Sa4CL2-cDNA	33
2.8	Klonierung in den Expressionsvektor pRSET B	37
2.9	Heterologe Expression von Sa4CL2	38
2.10	Aktivitätsüberprüfung rekombinanter Sa4CL-Isoformen	38
2.11	Charakterisierung von Sa4CL2	40
2.11.1	Molekülmasse	40
2.11.2	Enzymkinetik	41
2.11.3	Temperaturoptimum (optimale Umsatztemperatur)	45
2.11.4	pH-Optimum	46
2.11.5	Cofaktoren	47
2.12	Identifizierung des enzymatisch gebildeten Produkts	48
2.13	Klonierungsversuche von Ri4CL2	51
2.14	Expressionsanalyse von Sa4CL-Isoformen	51
2.14.1	Expression in Zellkulturen von S. aucuparia	52
2.14.2	Expression in intakten Pflanzen von S. aucuparia	53

3	Klonierung von CoA-Ligasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
3.1	Allgemeines	54
3.2	Selektion von AAEs der Tribus VI	54
3.3	Klonierung, heterologe Expression und Test auf enzymatische Aktivität	55
3.4	Sequenzvergleich mit At1g65880	56
4	Synthese von Aucuparin	57
4.1	Allgemeines	57
4.2	3,4,5-Trimethoxybiphenyl (Stufe 1)	57
4.3	3,4,5-Trihydroxybiphenyl (Stufe 2)	59
4.4	4-Hydroxy-3,5-dimethoxybiphenyl (Aucuparin)	60
4.5	Nebenprodukte der Synthese	61
III.	Diskussion	63
1	Benzoessäuren	63
2	p-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL)	68
3	Synthese	78
IV.	Material	81
1	Biologisches Material	81
1.1	Pflanzliche Zellkulturen	81
1.2	Differenziertes Pflanzenmaterial	82
1.3	Bakterienstämme und Plasmidvektoren	82
1.3.1	Bakterienstämme	82
1.3.2	Plasmidvektoren	82
2	Nukleinsäuren und Nukleotide	83
2.1	Oligonukleotide	83
3	Enzyme	85
4	Kits für die Molekularbiologie	85
5	Chemikalien und Reagenzien	86
5.1	Pflanzenzellkulturmaterial	86
5.2	Phytohormone	86
5.3	Bakterienkulturmaterial	86
5.4	Antibiotika	86
5.5	Reagenzien für Biochemie und Molekularbiologie	87
5.6	Reagenzien für die Gelelektrophorese	87
5.7	Reagenzien für die Synthese	88
6	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	88
6.1	Medien für Pflanzenzellkulturen	88
6.2	Medien für Bakterienkulturen	90
6.3	Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese	91
6.3.1	DNA-Auftrennung	91
6.3.2	Proteinauftrennung (SDS-PAGE)	91
6.4	Puffer zur Enzymreinigung	93
6.5	Puffer zur Plasmidisolierung	93
6.6	Sonstige Puffer und Lösungen	94
7	Geräte	95
V.	Methoden	97
1	Zellkulturtechniken	97
1.1	Anlegen von Pflanzenzellkulturen	97
1.2	Elizitierung von <i>in vitro</i> -Pflanzenzellkulturen	97

2	Methoden der Protein- und Biochemie	99
2.1	Zellfreie Extrakte aus Pflanzenmaterial	99
2.2	Shikimat-Dehydratase-Ansatz	99
2.3	Acetonextraktion von Pflanzenmaterial	100
2.4	Zellaufschluss bakterieller Expressionssysteme	100
2.5	Reinigung rekombinanter Proteine	100
2.6	CoA-Ligase-Ansatz	101
2.6.1	Inkubationen mit radioaktiv markiertem Substrat	101
2.6.2	Reinigung von enzymatisch gebildetem Produkt	102
2.7	Bestimmung kinetischer Parameter	102
2.8	Bestimmung des Proteingehalts	103
2.9	SDS-PAGE	103
2.10	Gelfiltration von Proteinen	104
2.11	Berechnung der Molekülmassen von Proteinen	104
3	Methoden der Molekularbiologie	105
3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	105
3.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	105
3.3	Design von Oligonukleotiden	106
3.3.1	Restriktionsschnittstellen in Expressionsprimern	106
3.4	Isolierung von RNA	106
3.4.1	Isolierung von poly(A ⁺)-RNA	106
3.4.2	Isolierung von gesamt-RNA	107
3.5	Reverse Transkription	107
3.5.1	cDNA-Synthese mittels SMART-RACE-Verfahren	107
3.5.2	cDNA-Synthese mittels H Minus M-MuLV RT	108
3.6	Polymerasekettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction)	108
3.6.1	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	110
3.6.2	RT-PCR	110
3.7	Agarose-Gelelektrophorese	111
3.7.1	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	111
3.8	Restriktion mit Typ II-Endonuklease	111
3.8.1	Restriktionsverdau für DNA-Fingerprints	112
3.9	Ligation von DNA-Fragmenten	113
3.9.1	Klonierung in das pGEM-T Easy Vektor System	113
3.9.2	Klonierung in das pRSET B Vektor System	114
3.10	Transformation von <i>E. coli</i>	114
3.10.1	Transfer von Plasmid-DNA in DH5 α	114
3.10.2	Transfer von Plasmid-DNA in BL21(DE3)pLysS	115
3.11	Isolierung von Plasmid-DNA	115
3.11.1	Insertionskontrolle	115
3.12	Quantifizierung von Nukleinsäuren	116
3.13	Heterologe Expression rekombinanter Proteine	116
3.14	DNA-Sequenzierung	117
3.14.1	Probenvorbereitung	117
3.14.2	PAGE für die DNA-Sequenzierung	118
3.15	Computergestützte Auswertung von DNA-Daten	119
4	Methoden der Synthese	120
4.1	Darstellung von 3,4,5-Trimethoxybiphenyl	120
4.2	Abspaltung von O-Methylschutzgruppen	122
4.3	Methylierung von 3,4,5-Trihydroxybiphenyl	123
5	Instrumentelle Analytik	125
5.1	High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	125
5.1.1	Instrumentierung	125
5.1.2	Gradientenprogramme	125
5.2	Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS)	126

5.2.1	Instrumentierung	127
5.2.2	Temperaturprogramm	127
5.3	Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie (MS/MS)	128
5.3.1	Instrumentierung	128
5.4	Kernresonanzspektrometrie (NMR)	129
VI.	Zusammenfassung	131
VII.	Literatur	133
VIII.	Anhang	145

Abkürzungsverzeichnis

- 2,4-D 2,4-Diphenoxyessigsäure
- 3-HBS 3-Hydroxybenzoesäure
- 4CL 4-Cumarat:CoA-Ligase
- A Ampere
- AMP Adenosin-5´-monophosphat
- amu atomic mass unit
- APS Ammoniumpersulfat
- *At* *Arabidopsis thaliana*
- ATP Adenosin-5´-triphosphat
- AU Absorption Unit
- BIS Biphenyl-Synthase
- bp Basenpaar
- BPS Benzophenon-Synthase
- BSA Bovines Serum Albumin, Rinderserumalbumin
- BZL Benzoat:CoA-Ligase
- *Ce* *Centaurium erythraea*
- cDNA copy-DNA
- CHS Chalkon-Synthase
- CoA Coenzym A
- cpm counts per minute
- Da Dalton
- dH₂O destilliertes Wasser
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- dNTP Desoxynukleosid-triphosphat
- ddNTP Didesoxynukleosid-triphosphat
- dsDNA Doppelstrang DNA
- DTT 1,4-Dithiothreitol
- *E. coli* *Escherichia coli*
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- EPI Enhanced product ion scan
- EtOH Ethanol
- FPLC Fast Protein Liquid Chromatography
- G Guanin
- GC Gaschromatographie; Guanosin/Cytidin
- h Stunde
- HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
- IPTG Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
- IR Infrarot-Spektroskopie
- kb Kilobase
- kDa Kilo-Dalton
- K_M Michaelis-Konstante
- l Liter
- M mol/l; molare Masse
- m Milli; Multipllett
- *m/z* Verhältnis Masse zu Ladung
- MCS Multiple Cloning Site
- MeOH Methanol
- min Minute
- MJ Methyljasmonat

- M-MuLV Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus
- mRNA messenger-Ribonukleinsäure, poly(A⁺)-RNA
- MS Massenspektrometrie
- MSTFA N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid
- NAA 1-Naphthylessigsäure
- NAD Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
- NCBI National Center of Biological Information
- NMR Nuclear magnetic resonance, Kernresonanz
- OD optische Dichte
- ORF open reading frame, offener Leserahmen
- p.a. pro analysi
- PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese
- PAL Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
- PCR Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
- *Ri* *Rubus idaeus*
- RACE Rapid Amplification of cDNA Ends
- rpm Umdrehungen pro Minute
- RT reverse Transkriptase
- s Singulett
- *Sa* *Sorbus aucuparia*
- SDS Natriumdodecylsulfat
- sec Sekunde
- ssDNA single-stranded DNA, Einzelstrang DNA
- TdT Terminale Nukleotid Transferase
- TEMED Tetramethylethylendiamin
- Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
- UV Ultraviolett
- V Volt
- X-GAL 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Aminosäuren

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

Nukleinbasen

A	=	Adenin
C	=	Cytosin
G	=	Guanin
T	=	Thymin
I	=	Inosin

I. Einleitung

1 Botanik relevanter Pflanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen gehören den Familien Gentianaceae und Rosaceae an. Es wurden außerdem Versuche mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* aus der Familie Brassicaceae durchgeführt.

1.1 *Centaurium erythraea* RAFN.

Das echte Tausendgüldenkraut aus der Familie Gentianaceae ist eine zweijährige, krautige Pflanze [Abbildung 1]. Mit vierkantigem Stängel im zweiten Jahr etwa 10-50 cm hoch gewachsen, bildet die Pflanze im ersten Wuchsjahr eine bodenständige Blattrosette. Die im Folgejahr gebildeten fünfzähligen Blüten sind von rot-violetter, selten weißer Farbe und zunächst röhrenartig verwachsen. Sie sind in flachen Trugdolden angeordnet. Die Blütezeit ist Juli bis September. Das Tausendgüldenkraut ist heimisch in Europa, auch Skandinavien, Westasien sowie in Nordafrika. Der botanische Name des Tausendgüldenkrautes leitet sich aus der griechischen Mythologie her. Der Zentaur *Chiron* hatte seine durch einen Pfeil verursachte Wunde am Fuß mit Hilfe des Krautes geheilt, so die Überlieferung des römischen Gelehrten *Plinius*. *Centaurium erythraea* war bei Ärzten der Antike bereits bekannt und so wurde die Heilpflanze schon von *Hippokrates* beschrieben (Fuchs, 1895). Im späteren Verlauf wurde der Pflanzename aus dem Lateinischen für „hundert“ (*centum*) und „golden“ (*aureus*) abgeleitet. Vermutlich durch einen Übersetzungsfehler gelangte man zum Tausend-Gülden-Kraut. Ebenso kann der Name über die Heilkraft der Pflanze erklärt werden, die in der volkstümlichen Medizin gegen Fieber, Wunden, Magen- und Menstruationsbeschwerden eingesetzt wurde. Sie war die „Tausend Gulden“ wert. Im deutschen Sprachraum sind unterdes viele Namen überliefert, die sich ebenfalls auf die Heilwirkungen beziehen. So zum Beispiel die Bezeichnungen Fieberkraut, Magenkraut, Apothekerkraut oder Gottesgnadenkraut.

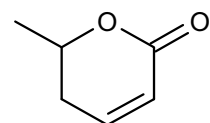
Die Droge *Centaurii herba*, die aus den oberirdischen Teilen der blühenden Pflanze gewonnen wird, enthält Bitterstoffe. Diese sind für die Gentianaceae typisch und

stammt auch der deutsche Begriff *Vogelbeere*. Die Beeren weisen eine geringe Giftigkeit auf, welche sich in einer Magenschleimhautreizung durch Parasorbinsäure darstellt [Abbildung 2]. Die Bezeichnung Sorbinsäure entstammt wiederum dem Gattungsnamen *Sorbus*. Durch Kochen der Früchte wird die Lactonstruktur der Parasorbinsäure zerstört, weshalb aus ihnen Marmeladen, Gelees und Säfte produziert werden können. Die Früchte enthalten viel Vitamin C und Provitamin A. Daneben sind Chlorogensäuren und Flavonoide enthalten (Gil-Izquierdo und Mellenthin, 2001). Sorbit kann aus den Früchten gewonnen werden, welches sich als Zuckeraustauschstoff für Diabetiker eignet und als osmotisch wirksames Laxans Anwendung findet. Als alkoholisches Genussmittel findet sich im österreichischen Raum ein Vogelbeerschnaps (Verstl, 1997). Das Holz der Eberesche findet in der Holzindustrie Anwendung, jedoch wird es dort meist nur zur Beimischung für die Produktion von Sperrholzplatten genutzt. Es kann wegen seiner faserigen Struktur auch zur Zellstoffgewinnung eingesetzt werden (Hillebrand und Leder, 1995). Die ökonomische Bedeutung der Eberesche ist in den beschriebenen Gebieten gering. Sie hat ihre größte Bedeutung als dekorativer Zierbaum in Park- und Gartenanlagen.

Wissenschaftlich wird die Gattung *Sorbus* unter anderem aufgrund ihrer Eigenschaft der ausgeprägten Hybridbildung (Nelson-Jones et al., 2002) und zur Untersuchung von genetischer Varianz (Bacles et al., 2004) in Forstbeständen betrachtet. Die nahe Verwandtschaft zum Apfel wird in der Untersuchung der Biosynthese von Biphenyl-Phytoalexinen wie z.B. dem Aucuparin genutzt (Liu et al., 2004).



Parasorbinsäure



Aucuparin

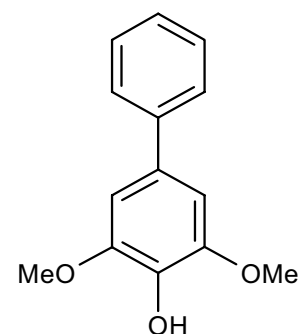


Abbildung 2: Blatt und Früchte der Eberesche (li), Inhaltsstoffe (re)

1.3 *Rubus idaeus* L.

Die Himbeere gehört wie die Eberesche zu den Rosengewächsen, Rosaceae. Hier fällt sie jedoch in die Unterfamilie Rosoideae, der z.B. auch Brombeere und Erdbeere angehören. Die Himbeere wächst strauchartig bis zu einer Höhe von 1,5-2 m. Die wechselständigen, meist 3 bis 7-zählig gefiederten Blätter sind auf der Unterseite weiß behaart. Der Blattrand der Teilblättchen ist gezähnt. Aus den weißen Blüten der rispenartigen Blütenstände bilden sich Sammelsteinfrüchte von roter bis schwarzroter Färbung. Zuchtformen können auch gelbe Früchte ausbilden. Die Himbeere ist in Europa, Nordasien und Nordamerika heimisch. Die Artbezeichnung *idaeus* leitet sich nach Aufzeichnungen des *Plinius* von dem Berg *Ida* auf Kreta ab. Die Früchte der Himbeere sind reich an Vitamin C und Flavonoiden (Mullen et al., 2002). Wie vielen anderen Vertretern der *Rosaceae* kommt der Himbeere eine große Bedeutung im Obstbau zu. Im pharmazeutischen Bereich werden die getrockneten Blätter als Fülldroge zur Mischungsstabilisierung in Arzneitees verwendet (Wichtl, 1997).

1.4 *Arabidopsis thaliana* L.

Die Acker-Schmalwand, auch Schotenkresse genannt, gehört zur Familie der Kreuzblütler, Brassicaceae. Die krautige, einjährige Pflanze erreicht eine Höhe von 30 cm. Die Blüten sind weiß und bringen Schotenfrüchte von 10-20 mm Länge hervor. Die Acker-Schmalwand ist von bedeutendem wissenschaftlichen Interesse, da sie als Modellorganismus für höhere Pflanzen etabliert ist. Die Aufklärung des relativ kleinen Genoms (125 Megabasen) der Pflanze wurde im Jahr 2000 abgeschlossen (The_Arabidopsis_Genome_Initiative, 2000). Weitere Vorteile dieses Modellorganismus sind die einfachen Kultivierungsbedingungen, die kurze Generationszeit und die Möglichkeit der Agrobakterien-vermittelten Transformation. Die Acker-Schmalwand bildet Senfölglykoside. Diese Glucosinolate sind β -Glucoside von Thiohydroximsäuren, die variable Seitenketten tragen. Innerhalb der Pflanze sind verschiedene Glucosinolate unterschiedlich stark in den Organen akkumuliert. So finden sich benzoyleierte Verbindungen hauptsächlich in den Samen (Brown et al., 2003).

2 Bedeutung relevanter Sekundärmetabolite

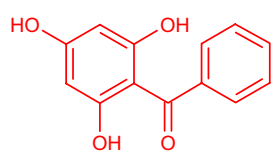
Stoffwechselforgänge lassen sich allgemein in Primär- und Sekundärmetabolismus einteilen. Der Primärmetabolismus beschreibt die unentbehrlichen, lebensnotwendigen Stoffwechselforgänge. Diese dienen der Erhaltung und Fortpflanzung und beinhalten z.B. den Protein- und Aminosäurestoffwechsel und die Stoffwechselwege der Energiegewinnung. Der Primärstoffwechsel ist hoch konserviert.

Der Sekundärmetabolismus zeichnet sich durch seine Vielfalt und abgegrenzte Verteilung aus. Er geht durch Genduplikation und Mutation aus dem Primärstoffwechsel hervor (Ober, 2005) und ist an die Überlebensbedingungen einzelner Arten oder Populationen angepasst. Der Sekundärmetabolismus ist also im Gegensatz zum Primärmetabolismus adaptiv. Er dient dem Überleben in Konkurrenz mit anderen Organismen, da er im jeweiligen Lebensraum einen Überlebensvorteil verschafft. Dabei können Sekundärmetabolite als die Produkte des Sekundärstoffwechsels z.B. einen Schutz vor Fressfeinden oder vor Infektion durch Krankheitserreger bieten. Häufig resultiert daraus eine Koevolution eng voneinander abhängiger Lebensformen, wie z.B. von spezialisierten Herbivoren.

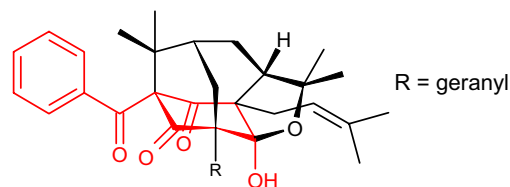
Einige dieser Sekundärmetabolite finden Anwendung als Arzneistoffe oder stellen Leitstrukturen für die Arzneimittelentwicklung dar. Einer der bekanntesten Vertreter solcher Sekundärmetabolite ist das Analgetikum Morphin aus dem Schlafmohn, *Papaver somniferum*.

2.1 Benzophenone

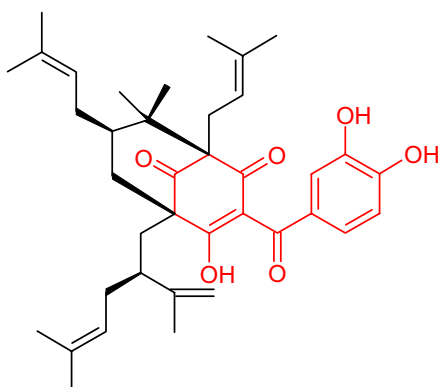
Benzophenone sind phenolische Sekundärmetabolite mit vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften. Sie stellen einerseits die biosynthetische Vorstufe der Xanthone dar, unterliegen aber andererseits auch Modifikationen unter Erhaltung der Benzophenonstruktur. Benzophenone finden sich hauptsächlich in Pflanzen der Familie Clusiaceae. Von besonderem Interesse sind die prenylierten Benzophenone [Abbildung 3]. Durch mehrfache Prenylierungs- und Zyklisierungsreaktionen entstehen so die tetrazyklischen Sampsonione, die z.B. in der chinesischen Heilpflanze *Hypericum sampsonii* gebildet werden. Sie weisen zytotoxische Eigenschaften auf (Hu und Sim, 1999) und beeinflussen die Apoptose (Zeng et al., 2006). Das ebenfalls polyprenylierte Garcinol aus *Garcinia indica* wirkt als Histon-Acyltransferase-Inhibitor auf die Zellteilungsrate und Genexpression und stellt dadurch eine interessante Leitstruktur für die Entwicklung von Therapeutika gegen Krebserkrankungen dar (Balasubramanyam et al., 2004). Als antiretrovirales Prinzip wurde das Guttiferon F aus *Allanblackia stuhlmannii* identifiziert (Fuller et al., 1999). Guttiferon A und F weisen darüber hinaus eine starke Aktivität gegenüber Erregern der Leishmaniose auf (Lenta et al., 2007).



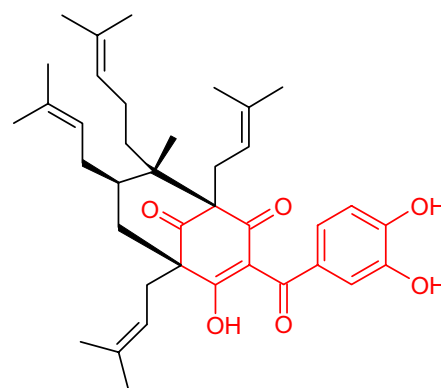
2,4,6-Trihydroxybenzophenon



Sampsonion A



Garcinol



Guttiferon A

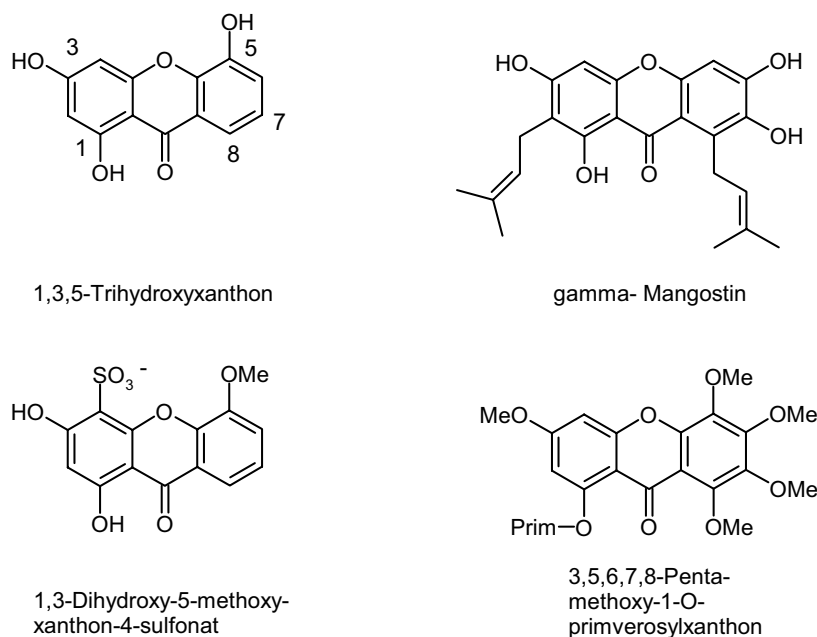
Abbildung 3: Prenylierte Benzophenon-Derivate

2.2 Xanthone

Xanthone werden durch intramolekulare Zyklisierung von Benzophenonvorstufen gebildet. Sie besitzen, wie auch die Benzophenone, unterschiedlichste pharmakologisch bedeutende Eigenschaften. Das Vorkommen der Xanthone beschränkt sich weitestgehend auf zwei Pflanzenfamilien, die Gentianaceae und die Clusiaceae. Vereinzelt finden sie sich in weiteren Pflanzenfamilien sowie in Pilzen und Flechten (Peres et al., 2000). Xanthone der Gentianaceae weisen häufig mehrere Methoxyfunktionen auf, sind aber im Gegensatz zu Vertretern aus den Clusiaceae nicht prenyliert [Abbildung 4]. So konnten in Zellkulturen von *Centaurium erythraea* polymethoxylierte Xanthone und in Zellkulturen von *Hypericum androsaemum* L. prenylierte Xanthone nachgewiesen werden (Beerhues und Berger, 1995; Schmidt et al., 2000). Xanthone können in Pflanzen sowohl als Glykoside wie auch als Ester der Sulfonsäure vorliegen (Hong et al., 2004).

Es sind vielfältige pharmakologische Eigenschaften beschrieben. So konnten antimikrobielle (Nkengfack et al., 2002), antimutagene (Schimmer und Mauthner, 1996), antiretrovirale (Groveiss et al., 2000) sowie zytotoxische und antitumorale (Abou Shoer et al., 1988) Wirkungen gezeigt werden. Xanthone sind potente Inhibitoren der Monoaminoxidase A und B (Suzuki et al., 1981). Obgleich dieser Effekt bei der Behandlung von Depressionen relevant ist, tragen die Xanthone wohl nicht zur Wirkung der als Antidepressivum eingesetzten Heilpflanze *Hypericum perforatum* bei. Verwendung findet hier das Kraut der Pflanze, die Xanthone sind jedoch hauptsächlich in der Wurzel lokalisiert (Greeson et al., 2001).

Daneben konnten antimykotische Wirkungen für Xanthone gefunden werden (Morel et al., 2002). Ebenso geht von 1,3,7-trioxydierten und in Position 2 und 8 prenylierten Xanthonen eine Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* aus (Hay et al., 2004). Darüber hinaus wurden auch vasorelaxierende Effekte für Xanthone beschrieben (Chericoni et al., 2003). γ -Mangostin, ein Xanthon aus *Garcinia mangostana*, hemmt die Cyclooxygenasen 1 und 2, wodurch es zu einer verringerten Freisetzung von Prostaglandin E₂ in C6-Gliomazellen von Ratten kommt (Nakatani et al., 2002).


Abbildung 4: Xanthon-Derivate

2.3 Biphenyle

Biphenyle gehören neben den strukturell verwandten Dibenzofuranen [Abbildung 5] zu den typischen Phytoalexinen der Maloideae, einer Unterfamilie der Rosaceae. Diese Sekundärmetabolite sind als Abwehrstoffe gegen Pilzinfektionen von Bedeutung. Sie unterbinden sowohl die Keimung von Sporen als auch das Myzelwachstum (Hrazdina et al., 1997). Das bekannteste Biphenyl ist das Aucuparin [Abbildung 2], welches in einigen Arten der Gattungen *Sorbus* und *Malus* zu finden ist (Narasimhachari und von Rudloff, 1962; Kokubun und Harborne, 1995). Das Vorkommen und die antimykotische Aktivität des Aucuparins ist auch für die Wollmispel *Eriobotrya japonica* Lindl. beschrieben (Watanabe et al., 1982). Neben dem Aucuparin kommen weitere, unterschiedlich substituierte Biphenyle in Pflanzen vor. Für *S. aucuparia* konnten fünf verschiedene Biphenyle identifiziert werden (Kokubun et al., 1995). Mit Ausnahme des Aucuparins, welches auch in Blättern von *S. aucuparia* vorkommt, akkumulieren diese Phytoalexine im Splintholz der Pflanzen. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit konnten Biphenyle und Dibenzofurane bislang nicht nebeneinander aus demselben Pflanzengewebe isoliert werden. Dennoch ließen sich in der Wollmispel das Dibenzofuran Eriobofuran in Blättern und Biphenyle im Holz nachweisen (Grayer und Kokubun, 2001). Auch in einem Zellsuspensionssystem von *Malus x domestica* cv. Liberty lassen sich beide Phytoalexinstrukturen finden. Da hier außerdem die

Substitutionsmuster identisch sind, kann von einem gemeinsamen Biosyntheseweg ausgegangen werden (Borejsza-Wysocki et al., 1999).

Aufgrund der ökonomischen Bedeutung des Apfels (*Malus spp.*) ist die Kenntnis der Resistenzentwicklung gegenüber pathogenen Erregern und die Aufklärung der Biosynthese dieser Phytoalexine von großem Interesse.

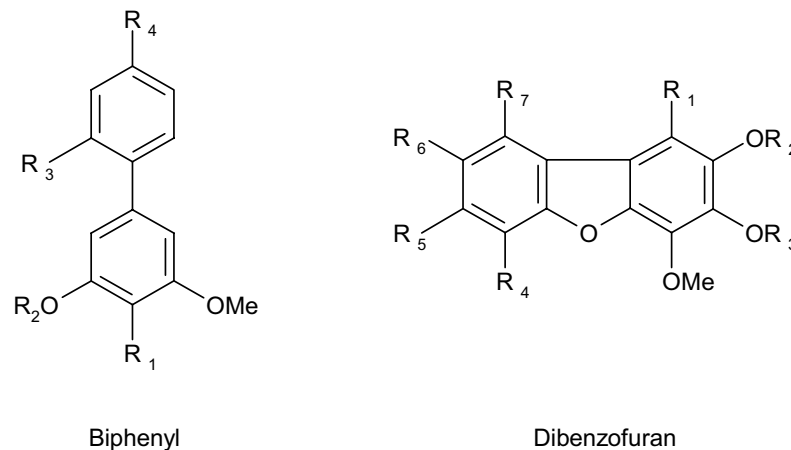


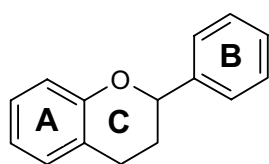
Abbildung 5: Biphenyl- und Dibenzofuran-Grundstrukturen (Kokubun und Harborne, 1995)

2.4 Flavonoide

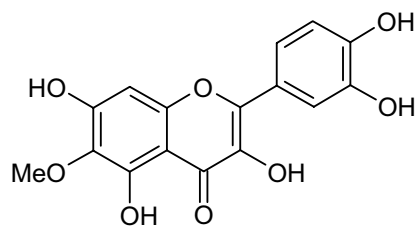
Flavonoide sind Polyphenole, die ubiquitär in Pflanzen vorkommen [Abbildung 6]. Über 4.000 unterschiedliche Verbindungen sind bekannt (Cook und Samman, 1996). Sie lassen sich aufgrund von Strukturmerkmalen in Gruppen einteilen. Diese sind beispielsweise Flavonole, Flavone, Flavanone, Catechine, Anthocyanidine, Isoflavone, Dihydroflavonole und Chalkone. Die allgemein als Flavonoide bezeichneten Stoffe werden von Pflanzen z.B. als Schutz vor UV-Strahlung gebildet. Flavonoide absorbieren im kurzwelligen UV-B Bereich (280-320 nm) und schützen so DNA, RNA und Proteine der Pflanze vor Schädigungen. Sind für die Biosynthese der Flavonoide essentielle Enzyme wie Chalkon-Synthase oder Chalkon-Isomerase nicht funktionsfähig, resultiert eine verringerte Toleranz gegenüber UV-Strahlung (Li et al., 1993). Eine weitere Funktion erfüllen Flavonoide als Farbpigmente. Mit ihrer Hilfe werden Insekten auf Nektarquellen aufmerksam gemacht und helfen so bei der Bestäubung der Pflanze. Solche Merkmale finden sich auch im für das menschliche Auge nicht sichtbaren UV-Bereich. So absorbiert z.B. das Patuletin in Blüten von

Rudbeckia hirta UV-Licht. Diese Pigmente werden von Insekten wahrgenommen und dienen als so genannte *Softmale* (Thompson et al., 1972).

Flavonoiden werden mannigfaltige pharmakologische Eigenschaften zugeschrieben. Neben der Beeinflussung von Enzymen, wie z.B. der Xanthinoxidase (Cos et al., 1998), wurden kardioprotektive (Hertog et al., 1993), antiatherosklerotische (Arai et al., 2000), antithrombotische und vasoprotektive (Gryglewski et al., 1987) Effekte beschrieben. Ebenso wurden antiinflammatorische (Kim et al., 1998), antitumorale (Caltagirone et al., 2000) und antivirale (Wang et al., 1998) Eigenschaften dokumentiert. Wichtige Bedeutung kommt den Flavonoiden als Antioxidantien zu. Dabei können reaktive Sauerstoffspezies über Flavonoide stabilisiert oder auch körpereigene oxidationshemmende Enzymsysteme, wie z.B. die Superoxid-Dismutase, unterstützt werden (Nijveldt et al., 2001). Diese antioxidativen Mechanismen sind an vielen der beschriebenen Effekte beteiligt. Auch das bekannte *French Paradox* wird teilweise über die antioxidative Wirkung von Flavonoiden erklärt (Formica und Regelson, 1995).



Grundstruktur



Patuletin

Abbildung 6: Grundstruktur der Flavonoide (li); Patuletin (re)

2.5 Lignin

Lignin ist ein Polymer aus aromatischen Untereinheiten, die sich vom Phenylalanin ableiten. Es ist nach Cellulose und vor Chitin das zweithäufigste Biopolymer und macht etwa 30% des gesamten Kohlenstoffs der Biosphäre aus (Boerjan et al., 2003). Es wird von Pflanzen hauptsächlich als Stützgewebe und zur Abdichtung genutzt. Lignin dient beim Flüssigkeitstransport der Abdichtung von z.B. Tracheen im Xylem der Pflanzen. Daneben spielt Lignin auch eine Rolle bei der Pathogenabwehr. Hier werden vor allem frühe Biosyntheseprodukte in die Zellwand eingelagert (Zhang et al., 2007) und so das Ausbreiten einer Infektion mechanisch eingedämmt.

Das Ligninpolymer setzt sich aus den monomeren Monolignol-Untereinheiten zusammen. Davon sind *p*-Cumarylalkohol, Koniferylalkohol und Sinapylalkohol die wichtigsten Vertreter. Daneben kommen aber auch andere Hydroxymethylalkohole und Hydroxymethylsäureester vor. Der Anteil an bestimmten Monolignolen lässt eine Einteilung in verschiedene Lignine zu. Dabei unterscheidet man anhand des Substitutionsmusters *p*-Hydroxyphenyl-Einheiten (H) von Guaiacyl-Einheiten (G) und Syringyl-Einheiten (S) [Abbildung 7]. Es kommen im Hartholz von dikotylen Pflanzen fast ausschließlich G- und S- Einheiten vor. Das Weichholz der Gymnospermen dagegen besteht hauptsächlich aus G- Einheiten und einem geringen Anteil an H- Einheiten. Das Lignin der Gräser (monokotyl) setzt sich aus gleichen Anteilen G- und S- Einheiten zusammen, enthält aber im Gegensatz zum Lignin der Dikotylen einen höheren Anteil an H- Einheiten (Baucher et al., 1998).

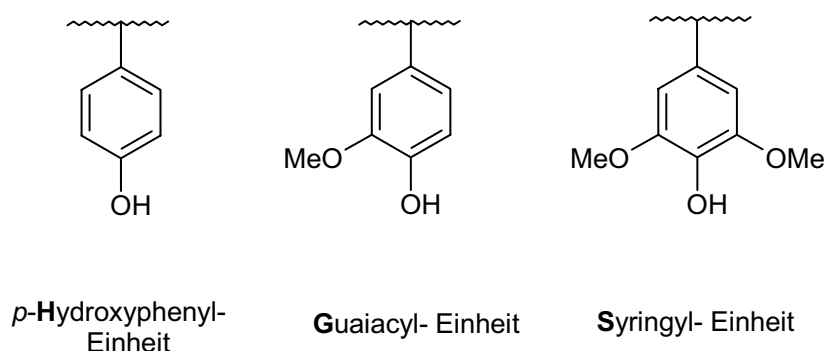


Abbildung 7: Substitutionsmuster an Monolignol-Einheiten

3 Biosynthese relevanter Sekundärmetabolite

3.1 Biosynthese und Aktivierung von Benzoessäuren

Benzoessäuren und Benzoessäurederivate sind in der Natur verbreitete Strukturmerkmale von Sekundärmetaboliten. Sie kommen als flüchtige Bestandteile in Blütendüften vor (Raguso und Pichersky, 1995), sind Ausgangspunkt für weitergehende Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten und als deren Substituenten für die Vielfalt der Sekundärstoffe mitverantwortlich. So kommt zum Beispiel der 2-Hydroxybenzoessäure, der Salicylsäure, eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der Pathogenabwehr der Pflanzen zu (Malamy et al., 1990). Salicylsäure spielt als Signalmolekül eine bedeutende Rolle bei der unspezifischen oder systemisch erworbenen Resistenz (Systemic Aquired Resistance, SAR) (Klessig und Malamy, 1994). Der Methylester, Methylsalicylat, ist als flüchtiger Stoff an der Kommunikation bei Pathogenbefall, sowohl innerhalb der Pflanze als auch gegenüber benachbarten Pflanzen eines Standortes, beteiligt (Shulaev et al., 1997). Als Substituenten sind Benzoessäuren auch für die Wirksamkeit von arzneilich eingesetzten Sekundärmetaboliten bedeutsam. Die Wirkung des antitumoralen Paclitaxels (Taxol®) ist an die Benzoylierung des C-3' des Baccatin III gebunden (Kirikae et al., 1996). Als weiteres Beispiel kann das Tropanalkaloid Kokain genannt werden. Hier wird zunächst aus Ornithin über Putrescin unter Ringschluss und Reduktion der Ketofunktion das Methylecgonin gebildet, welches dann mit Benzoyl-CoA zu Kokain verestert wird. Aktivierte Benzoessäuren dienen darüber hinaus als Startersubstrat für Polyketid-Synthase-Reaktionen [I.3.2].

Im Gegensatz zur Bedeutung der Benzoessäuren und Benzoessäurederivate ist die Biosynthese dieser aromatischen Verbindungen in Pflanzen noch nicht vollständig verstanden. Es werden hier grundsätzlich zwei mögliche Biosynthesewege diskutiert. Zum einen ist eine direkte Ableitung von Benzoessäuren aus dem Shikimat, Chorismat bzw. Isochorismat denkbar. Zum anderen können sie aber auch aus Phenylalanin bzw. Zimtsäure hergeleitet werden.

Die Biosynthese von Benzoessäurederivaten aus Zwischenprodukten des Shikimatweges konnte in mehreren retrobiosynthetischen ¹³C-NMR Arbeiten gezeigt werden. Dabei deuten die Markierungsmuster von Intermediaten und gebildeten Sekundärmetaboliten auf einen direkten Biosyntheseweg aus Shikimat hin. Wang et

al. (2003) erarbeiteten diesen Zusammenhang für die Biosynthese von Xanthonen in *Swertia chirata*, ebenso wie Werner et al. (1997) für die Biosynthese der Gallussäure in *Rhus typhina*.

In ICS1-Mutanten von *A. thaliana* konnte ferner eine direkte Korrelation zwischen der Salicylsäure-Biosynthese und der Aktivität der Isochorismat-Synthase (ICS1) belegt werden (Wildermuth et al., 2001). Demnach könnte Salicylsäure direkt aus der Vorstufe Isochorismat durch Abspaltung von Pyruvat hervorgehen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass in Zellkulturen von *C. erythraea* radioaktiv markierte 3-Hydroxybenzoesäure in Xanthone inkorporiert wird, an Stelle von Zimtsäure in Zellkulturen von *Hypericum androsaemum* (Abd El-Mawla et al., 2001). Ein biochemischer Nachweis von Reaktionen, die von Zwischenprodukten des Shikimatwegs zu Benzoesäuren führen, ist bislang nicht belegt.

Für Bakterien sind ähnliche Reaktionen jedoch bekannt, wie etwa die Reaktion der 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure-Synthase bei der Biosynthese von Rifamycin B in *Amycolatopsis mediterranei* (Kim et al., 1998).

Für die Biosynthese der Benzoesäure ausgehend von Phenylalanin bzw. Zimtsäure wurden drei verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen [Abbildung 8]. Dabei kam zum einen ein der β -Oxidation der Fettsäuren ähnlicher Weg in Betracht. Ausgehend von der aktivierten *trans*-Zimtsäure, Cinnamoyl-CoA, wird an die Doppelbindung der Seitenkette Wasser addiert, die neu entstandene β -Hydroxyfunktion oxidiert und die Seitenkette durch eine thioklastische Spaltung um eine C_2 -Einheit verkürzt. Produkt der Reaktion ist die bereits durch Coenzym A aktivierte Benzoesäure. Abgesehen von der möglichen Aktivierung der Zimtsäure durch *p*-Cumarat:CoA-Ligasen konnten noch keine weiteren Enzyme dieses Biosyntheseweges identifiziert werden. Für *Nicotiana attenuata* und *Cumunis sativus* wurde dieser Weg vorgeschlagen, da isopenmarkierte 3-Hydroxy-3-phenylpropansäure nicht zu markiertem Benzaldehyd degradiert wurde (Jarvis et al., 2000). Eine ähnliche Beobachtung konnte von Ribnicky et al. (1998) ausgehend von isopenmarkiertem Phenylalanin in *Nicotiana tabacum* gemacht werden.

Eine zweite Möglichkeit ergibt sich aus der nicht aktivierten Zimtsäure. Dabei wird ebenfalls nach Wasseranlagerung eine Retro-Aldolreaktion angenommen. Intermediat der Reaktion ist das Benzaldehyd, welches dann NAD^+ -abhängig zu Benzoesäure oxidiert werden kann (Schnitzler et al., 1992). Eine Verkürzung der Seitenkette um eine C_2 -Einheit auf diese Weise konnte für die Reaktion von

p-Cumarsäure zu *p*-Hydroxybenzaldehyd in Wurzelhaarkulturen von *Daucus carota* gezeigt werden (Sircar und Mitra, 2007).

Von Abd El-Mawla und Beerhues (2002) wurde für *Hypericum androsaemum* eine weitere Möglichkeit gefunden [Abbildung 8]. Nach dieser Darstellung kommt es CoA-abhängig zur Aktivierung der Zimtsäure, woran sich die Verkürzung der Seitenkette durch eine bifunktionelle Enoyl:CoA-Hydratase/Lyase anschließt. Das Intermediat Benzaldehyd wird wiederum zur Benzoesäure oxidiert. Die genannte Enoyl:CoA-Hydratase/Lyase ist z.B. für das Bakterium *Pseudomonas fluorescens* beschrieben, wo sie die Biosynthese von Vanillin aus Feruloyl-CoA katalysiert (Gasson et al., 1998). Für Pflanzen ist das beschriebene Enzym bislang nicht genetisch identifiziert.

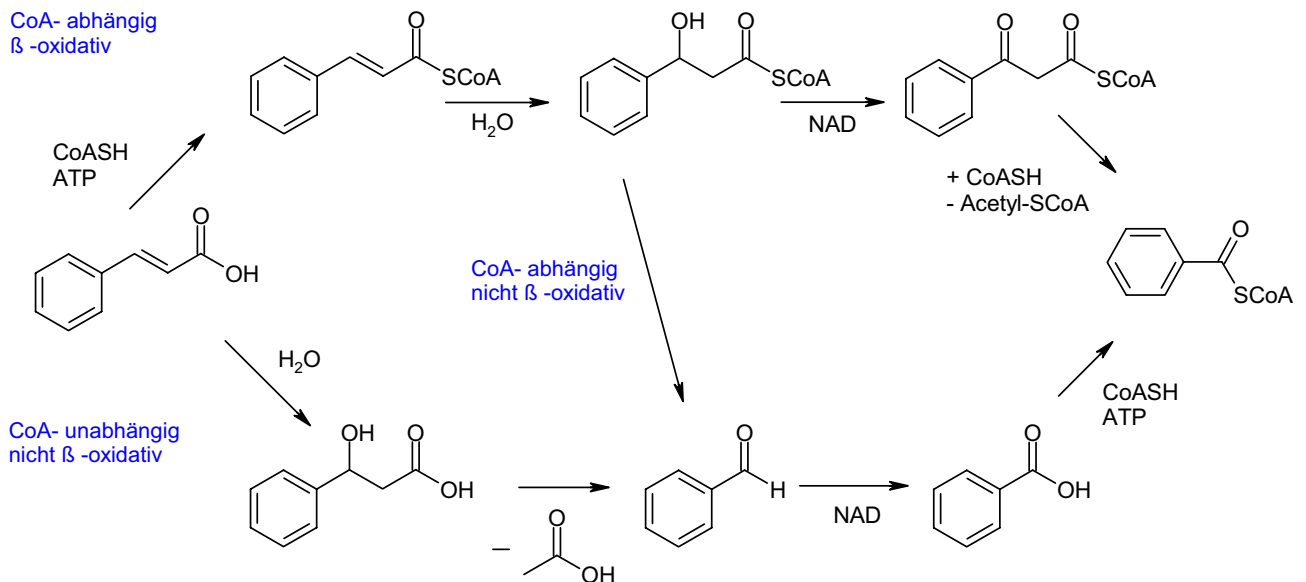


Abbildung 8: Postulierte Biosynthesewege der Benzoesäure ausgehend von Zimtsäure (Abd El-Mawla und Beerhues, 2002)

Benzoensäuren unterliegen selbst Modifikationen und sie stellen Ausgangsverbindungen für weitere Biosynthesewege dar. Häufig wird hier die aktivierte Form Benzoyl-CoA umgesetzt. Die Aktivierung der Benzoensäure durch Veresterung mit Coenzym A wird von einer Coenzym A-Ligase katalysiert. Für Pflanzen ist eine solche Benzoat:CoA-Ligase (BZL) erst kürzlich aus *A. thaliana* zum ersten Mal genetisch identifiziert worden (Kliebenstein et al., 2007). Allerdings liegen bisher noch keine kinetischen und Spezifitätsdaten für dieses Enzym vor. Eine Aktivierung über

bekannte *p*-Cumarat:CoA-Ligasen, die ausschließlich C6-C3-Substrate aktivieren, ist nicht belegt. Bisher partiell gereinigte pflanzliche BZLs zeigen des Weiteren keine Aktivität gegenüber C6-C3-Substraten (Barillas und Beerhues, 1997; Beuerle und Pichersky, 2002). Sie aktivieren ausschließlich Derivate der Benzoesäure. Die bislang aus Bakterien genetisch und biochemisch identifizierten Benzoat:CoA-Ligasen sind ihrerseits selektiv gegenüber C6-C1-Substraten (Geissler et al., 1988; Auburger und Winter, 1992).

3.2 Biosynthese von Polyketiden

Polyketid-Synthasen katalysieren allgemein die Kettenverlängerung ihrer Startersubstrate um Acetyl-Einheiten. Die auch als PKS bezeichneten Enzyme lassen sich in drei Klassen einteilen, die sich vermutlich alle aus dem Fettsäurestoffwechsel ableiten lassen. Zur Klasse I (PKS I) gehört als bekanntester Vertreter die Erythromycin-Synthase. Sie besteht strukturell aus drei multifunktionalen Polypeptiden von jeweils etwa 350 kDa, die wiederum Module mit mehreren Domänen ausbilden. PKS II-Enzyme sind hingegen Multienzymkomplexe monofunktionaler Proteine.

Die Polyketid-Synthasen der Klasse III sind ihrerseits kleinere Homodimere mit einem Molekulargewicht von etwa 85 kDa. Funktionell unterscheiden sie sich von den anderen Klassen durch die direkte Kondensation von Malonyl-CoA mit dem jeweiligen Substrat. Eine Übertragung durch ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) findet hier nicht statt. Neben der Kettenverlängerung durch PKS III katalysieren diese Proteine auch häufig anschließende Zyklisierungsreaktionen. Der bekannteste Vertreter der PKS III ist die Chalkon-Synthase (CHS), welche als Schlüsselenzym der Flavonoid-Biosynthese ubiquitär im Pflanzenreich auftritt. Von ihr leiten sich weitere angepasste Polyketid-Synthasen mit diversen Substrat- und Produktspezifitäten ab. Beispielsweise katalysieren die Benzophenon-Synthase (BPS) und die Biphenyl-Synthase (BIS) ausgehend von der Kondensation von einem Molekül Benzoyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA unterschiedliche Zyklisierungsmechanismen [Abbildung 9]. Bei der BPS-katalysierten Reaktion kommt es durch eine Claisenkondensation zu einer C6→C1-Verknüpfung. Die BIS katalysiert hingegen eine C2→C7-Verknüpfung über eine Aldolkondensation (Liu et al., 2007). Somit stellen BPS und BIS die zentralen Elemente der Biosynthese der Benzophenone und Xanthone bzw. der Biphenyle dar.

3.3 Biosynthese von Phenylpropanen

Phenylpropane sind in Pflanzen ubiquitär vertreten. Zu den wichtigsten Mitgliedern dieser großen Stoffgruppe zählen neben Flavonoiden und den Monolignol-Einheiten des Lignins die Cumarine und Stilbene wie z.B. das Psoralen bzw. Resveratrol. Die C6-C3-Grundgerüste leiten sich aus dem Primärstoffwechsel über Phenylalanin ab. Ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat werden die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin über den Shikimatweg gebildet. Der Übergang zum Sekundärstoffwechsel vollzieht sich über das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), welches aus Phenylalanin Zimtsäure freisetzt. Eine Hydroxylierung der Zimtsäure findet über die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) statt, eine Cytochrom P450 Monooxygenase. Die so entstandene *p*-Cumarsäure wird durch die *p*-Cumarat:CoA-Ligase (4CL) aktiviert.

4CLs zählen zu der Superfamilie der so genannten Adenylat-bildenden Enzyme oder auch „acyl-activating enzymes“ (AAE). Sie sind charakterisiert durch die Aktivierung von Säurefunktionen unter ATP-Verbrauch. Obwohl strukturell unterschiedlich, teilen diese Enzyme konservierte Motive innerhalb ihrer Aminosäuresequenzen. Diese wurden für eine Klassifizierung und Einteilung dieser Superfamilie herangezogen (Turgay et al., 1992). Bei der durch 4CLs katalysierten Reaktion kommt es zunächst zur Ausbildung eines Acyl-Adenylats unter Freisetzung von Pyrophosphat. In einem zweiten Schritt wird die Acylgruppe auf Coenzym A übertragen und AMP wird freigesetzt (Knobloch und Hahlbrock, 1975). Der beschriebene Mechanismus ist verbreitet für Enzyme mit vielfältigen Substratspezifitäten, wie Fettsäure:CoA-Ligasen, Acetyl:CoA-Ligasen und 4CLs. Abweichend vom dargestellten Ablauf sind auch Beispiele für die Bildung von ADP beschrieben worden (Sanchez et al., 2000), woraus sich die Klasse der „ADP-forming enzymes“ begründet.

Produkte der 4CL-Reaktion sind das jeweils aktivierte Zimtsäurederivat und AMP. Zimtsäurederivate wie *p*-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und die Zimtsäure selbst sind die physiologischen Substrate der 4CL. Als Cofaktoren werden zweiwertige Kationen wie Magnesium benötigt. 4CL ist nicht nur an der Flavonoid-, sondern gleichfalls an der Ligninbiosynthese beteiligt. Die bekannten 4CLs lassen sich folgerichtig sowohl funktionell als auch strukturell in Klassen einteilen. Klasse I-4CLs sind an der Ligninbiosynthese beteiligt, Klasse II-4CLs an der Biosynthese der

Flavonoide. Klasse III-4CLs gruppieren sich als Vertreter der monokotylen Pflanzen ebenfalls eigenständig.

Durch 4CL können *in vitro* (di)Adenosin-Polyphosphate dargestellt werden. Ob diese Reaktion auch *in vivo* von Bedeutung ist, z.B. als regulatorisches Element, ist unklar (Pietrowska-Borek et al., 2003).

3.3.1 Biosynthese von Flavonoiden

Die Biosynthese des Flavonoid-Gerüsts vollzieht sich über die Chalkon-Synthese. Dabei dient *p*-Cumaroyl-CoA als Startersubstrat für die Polyketid-Synthese.

Flavonoide entstehen durch Kondensation von *p*-Cumaroyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA unter Katalyse der CHS, wobei zunächst das Naringenin-Chalkon hervorgeht. Über die Chalkon-Isomerase wird das entsprechende Flavanon gebildet [Abbildung 10]. Von diesem Vorläufer aus können nun durch weitere enzymatische Schritte die strukturell vielfältigen Flavonoide gebildet werden. Daran beteiligt sind u.a. Isomerasen, Hydroxylasen und Oxidoreduktasen.

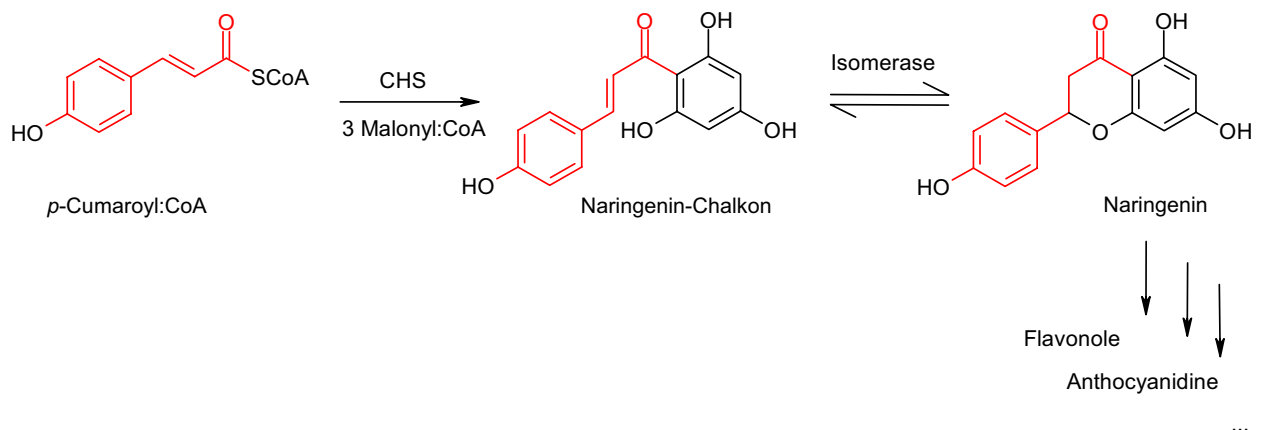


Abbildung 10: Biosynthese von Flavonoiden

3.3.2 Biosynthese von Lignin

Die Biosynthese des komplexen Lignins basiert auf der Bereitstellung von Monolignolen. Auch hier ist die aktivierte *p*-Cumarsäure ein zentraler Baustein. Die Aktivierung erfolgt ebenfalls über 4CL, allerdings der Klasse I. Das gebildete *p*-Cumaroyl-CoA wird zum Alkohol reduziert (H-Einheit) oder am aromatischen Molekülteil weiter hydroxyliert und methyliert. Es entstehen so die unterschiedlichen Monolignole [I.2.5]. Für die Biosynthese der Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten wird *p*-Cumaroyl-CoA mit Chinasäure oder Shikimisäure verestert. Diese Ester können über das Enzym *p*-Cumarat-3-Hydroxylase (C3H) in die entsprechenden Kaffeesäureester umgesetzt werden, die ihrerseits enzymatisch zu Kaffeoyl-CoA weiterreagieren (Boerjan et al., 2003). Das Produkt ist dann Substrat für die entsprechende *O*-Methyltransferase (CCoAOMT) und es entsteht Feruloyl-CoA. Dieses wird über die Cinnamoyl:CoA-Reduktase (CCR) zu Coniferylaldehyd reduziert. Coniferylaldehyd ist einerseits die direkte Vorstufe des Coniferylalkohols (G-Einheit), welcher über die Coniferylalkohol-Dehydrogenase (CAD) entsteht. Andererseits kann aus dem Aldehyd über die Coniferylaldehyd-5-Hydroxylase (CAld5H) sowie Methylierung durch 5-Hydroxyconiferylaldehyd-*O*-Methyltransferase (AldOMT) und Reduktion durch die Sinapylalkohol-Dehydrogenase (SAD) Sinapylalkohol (S-Einheit) biosynthetisiert werden (Chiang, 2006).

Eine direkte Ableitung von S-Einheiten wurde auch unter Beteiligung von 4CLs vorgeschlagen, da mit *At4CL4* aus *A. thaliana* ein Enzym beschrieben wurde, welches Sinapinsäure als Substrat akzeptiert (Hamberger und Hahlbrock, 2004). Damit wäre eine Reduktion von Sinapoyl-CoA zu Sinapylalkohol denkbar, analog der Biosynthese der H-Einheiten aus *p*-Cumaroyl-CoA. Die physiologische Bedeutung dieser erweiterten Substratspezifität der *At4CL4* für die Ligninbiosynthese wurde jedoch für *A. thaliana* über Knock-out Experimente in Frage gestellt (Costa et al., 2005). Allerdings wurde schon früher für *Robinia pseudoacacia* L. und für *Nerium indicum* Mill. (Oleander) ein Zusammenhang zwischen Sinapat-aktivierenden 4CLs und dem Anteil an S-Einheiten im Lignin gefunden. Diese Untersuchungen aus Xylemextrakt deuten daher auf die Existenz verschiedener Biosynthesewege von S-Einheiten hin (Yamauchi et al., 2003). Dass generell eine Beeinflussung der Ligninstruktur allein über die Regulation von 4CL möglich ist, konnte mit Hilfe von transgenen Tabakpflanzen und in *A. thaliana* gezeigt werden (Kajita et al., 1996; Lee et al., 1997).

Der polymere Aufbau des Lignins aus den Monolignolen verläuft über einen radikalischen Mechanismus. Ausgehend von einer initialen Dimerisierung werden neue Monomere meist β -ständig an das wachsende Polymer angeknüpft [Abbildung 11].

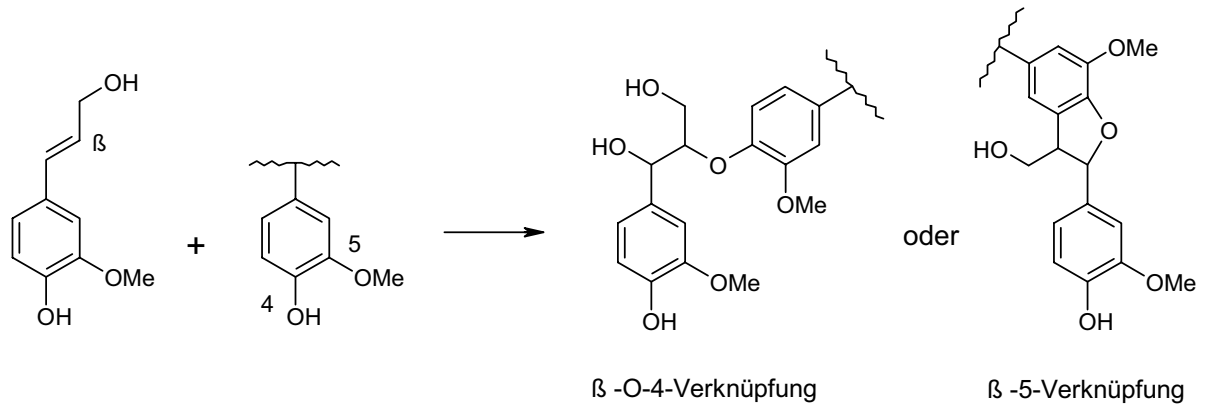


Abbildung 11: Beispiele für Lignifizierungsreaktionen

4 Zielsetzungen

Benzoensäuren stellen ein wichtiges Merkmal vieler sowohl botanisch als auch pharmazeutisch relevanter Sekundärmetabolite dar. Beispielsweise sind sie bei der Biosynthese der Xanthone das Startersubstrat der Benzophenon-Synthase und daher von zentraler Bedeutung. Dennoch ist die Biosynthese der Benzoensäuren bisher nur wenig verstanden.

Um zur Aufklärung der Biosynthese der Benzoensäuren beizutragen, sollten biochemische Untersuchungen an Zellkulturen von *Centaurium erythraea* durchgeführt werden. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung der direkten Ableitung von 3-Hydroxybenzoensäure aus Shikimisäure.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung, heterologe Expression und Charakterisierung von Coenzym A-Ligasen aus *Sorbus aucuparia*. Deren mögliche Rolle bei der Biosynthese der Biphenyle wurde untersucht.

Schließlich sollte für die analytische Aufklärung von unterschiedlich substituierten Biphenylen eine chemisch-synthetische Methode zur Darstellung dieser Verbindungen gefunden werden.

II. Ergebnisse

1 Untersuchung der Biosynthese von 3-Hydroxybenzoesäure in Zellkulturen von *Centaurium erythraea*

1.1 Allgemeines

Zellkulturen von *C. erythraea* sind in der Lage Xanthone zu bilden. Als konstitutiv gebildete Verbindungen treten 1,8-Dihydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyxanthon, 1-Hydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxyxanthon und vor allem das 1-O-Primverosyl-derivat des genannten Pentamethoxyxanthons auf. Nach Elizitierung mit Methyljasmonat ist zusätzlich das 1-Hydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyxanthon in hoher Konzentration zu detektieren (Beerhues und Berger, 1995). Durch Analyse des Xanthongehaltes in den Zellkulturen lässt sich der Status der Biosyntheseaktivität und die Ansprechbarkeit gegenüber Elizitierung überprüfen. Eine zentrale Vorstufe bei der Biosynthese der Xanthone in Gentianaceae stellt die 3-Hydroxybenzoesäure dar. Sie leitet sich in Zellkulturen von *C. erythraea* aus einem Zwischenprodukt des Shikimatwegs ab. Eine Ableitung dieser Vorstufe aus Zimtsäure konnte in Versuchen mit radioaktiv markierten Verbindungen nur für Zellkulturen von *Hypericum androsaemum* (Clusiaceae) gefunden werden, nicht aber für solche von *C. erythraea* (Abd El-Mawla et al., 2001).

1.2 Zellkulturen

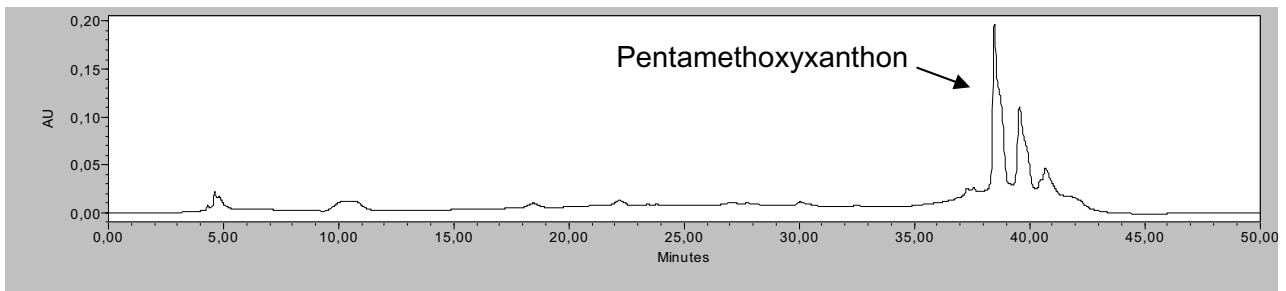
Kalluskulturen und Suspensionskulturen von *C. erythraea* waren im Arbeitskreis bereits vorhanden. Der Wachstumsverlauf der Suspensionskulturen zeigte eine Verdopplung der Zellmasse etwa alle 10 Tage. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellkulturen zur Erhaltung in frisches LS-Medium aufgeteilt bzw. 3 g Frischgewicht der Zellen als definierte Startmasse für folgende Experimente in LS-Medium gegeben.

Die Suspensionskulturen ließen sich durch Zugabe von Methyljasmonat elizitieren [V.1.2]. Fünfzehn Stunden nach Zugabe des Elizitors war eine deutliche Intensivierung der gelb-grün-Färbung der Zellkulturen zu beobachten.

1.3 Nachweis von Xanthonen

Die Zellkulturen wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Xanthone zu bilden. Dazu wurden jeweils aus mit Methyljasmonat elizitierten und unbehandelten Zellkulturen nach 72 h Acetonextrakte [V.2.3] gewonnen und mittels HPLC und GC-MS untersucht [V.5]. Dabei konnten die Ergebnisse von Beerhues und Berger (1995) bestätigt werden. In elizitierten Kulturen wurde bei der HPLC-Analyse neben dem 1-Hydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxyxanthon ebenfalls das 1-Hydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyxanthon detektiert [Abbildung 12].

a) Acetonextrakt aus nicht elizitierter Zellkultur



b) Acetonextrakt aus elizitierter Zellkultur

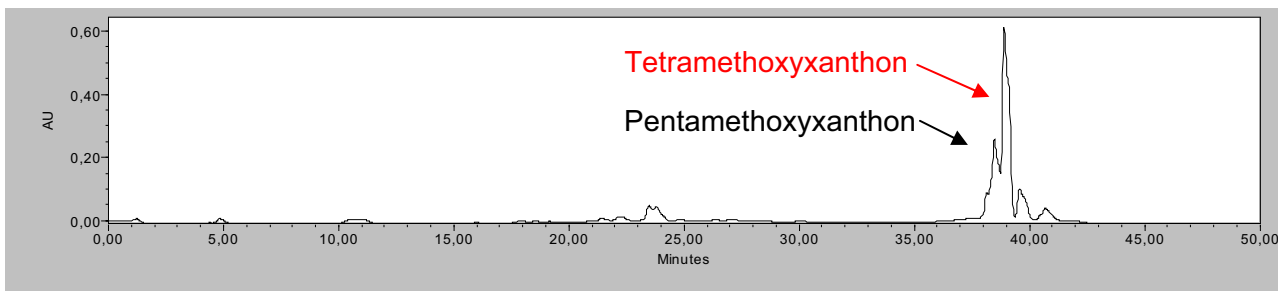
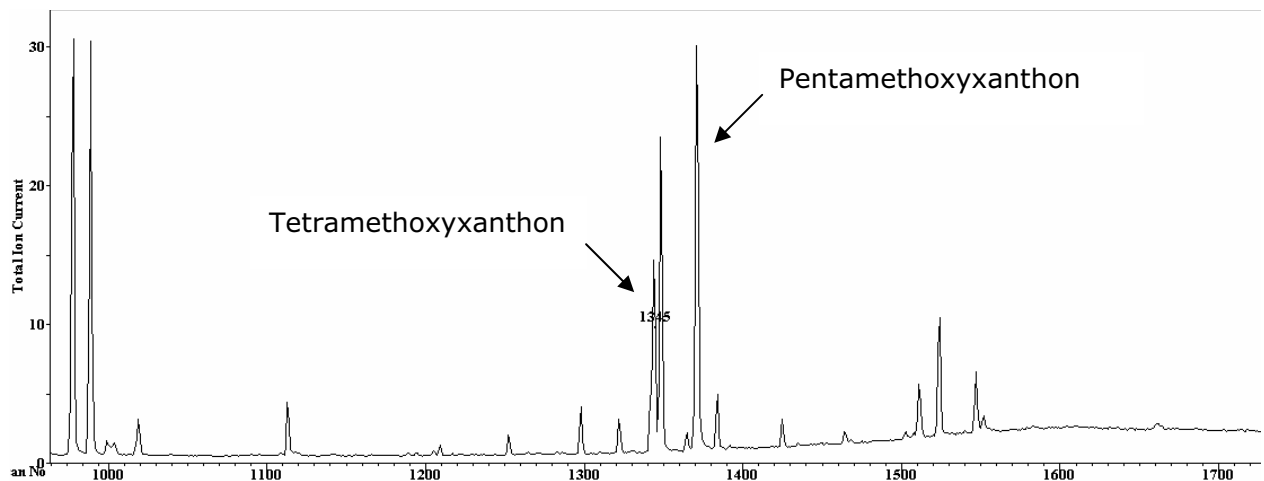


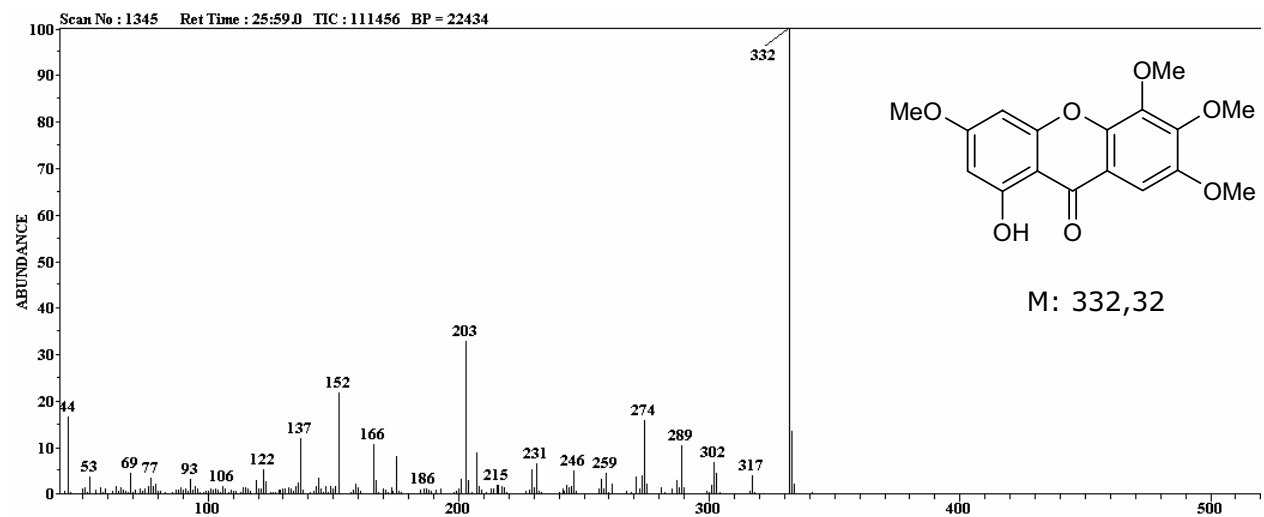
Abbildung 12: HPLC-Analyse von Acetonextrakten aus *C. erythraea* (unterschiedliche Skalierung)

Aus diesem Extrakt konnten mittels GC beide Verbindungen getrennt und durch EI-Massenspektrometrie charakterisiert werden [Abbildung 13].

a) „Total ion chromatogram“ (TIC) des Acetonextrakts (Ausschnitt)



b) Massenspektrum von 1-Hydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyxanthon



c) Massenspektrum von 1-Hydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxyxanthon

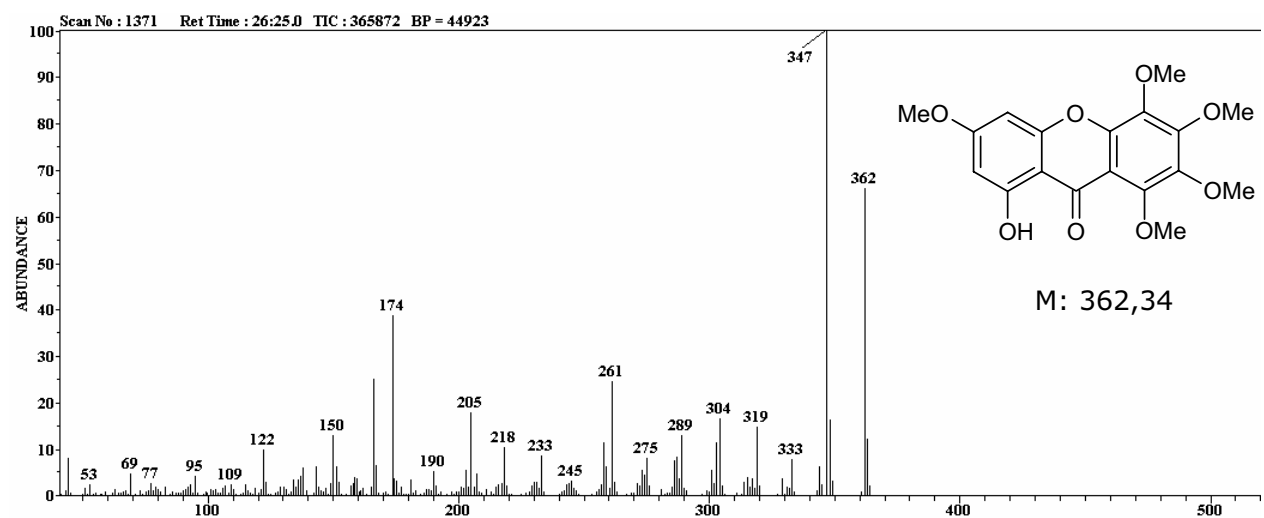


Abbildung 13: GC-MS eines Acetonextrakts aus elizierter Zellkultur

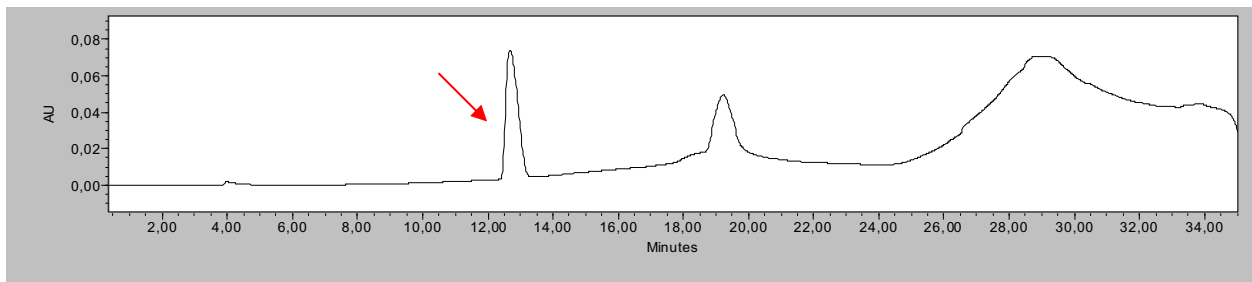
1.4 Detektion von Enzymaktivität

Für Zellkulturen von *Centaurium erythraea* konnte gezeigt werden, dass nur 3-Hydroxybenzoesäure (3-HBS) als Vorstufe in die Xanthon-Biosynthese eingeht, nicht aber Zimtsäure (Abd El-Mawla et al., 2001). Dieser erste Hinweis auf eine direkte Ableitung der Benzoesäure aus dem Shikimatweg wurde biochemisch untersucht. Dazu wurden zellfreie Extrakte [V.2.1] aus *C. erythraea*-Zellkulturen mit Shikimisäure, ATP und $MgCl_2$ inkubiert und die Ansätze mittels HPLC analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass in mit Methyljasmonat elizitierten Zellkulturen eine ATP-abhängige Umsetzung von Shikimisäure zu 3-HBS stattfand [Abbildung 14]. Eine solche Reaktion war weder für nicht elizitierte Zellkulturen noch für denaturierte Proteinextrakte aus elizitierten Zellkulturen nachweisbar. Es handelt sich also bei der detektierten 3-HBS eindeutig um ein enzymatisch gebildetes Produkt. Dieses Produkt zeigte mit der authentischen Referenzsubstanz 3-Hydroxybenzoesäure Koelution.

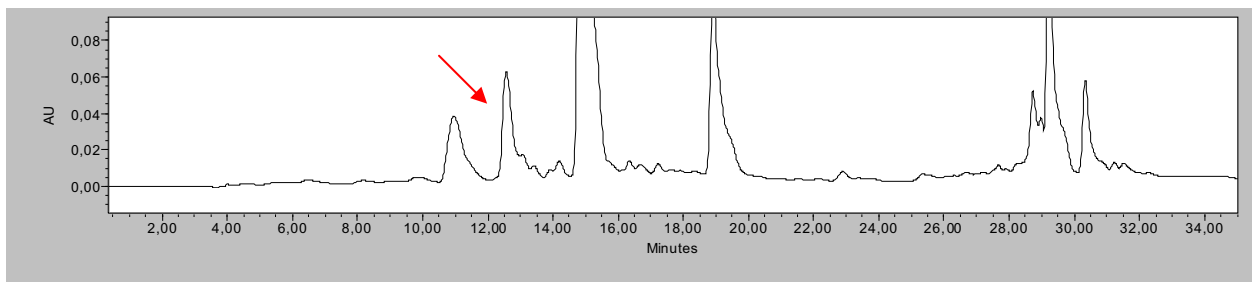
1.5 Stabilität von Enzymextrakten

Zellfreie Extrakte aus Zellkulturen von *C. erythraea* wiesen nur eine sehr begrenzte Lagerfähigkeit auf. Gekühlt bei 4 °C konnten nach etwa 12 h noch 50% der Enzymaktivität gefunden werden. Extrakte, die bei -20 °C eingefroren waren, zeigten keine Aktivität mehr. Im Gegensatz dazu wurde Aktivität auch über einen Zeitraum von vier Stunden unter Inkubationsbedingungen teilweise erhalten.

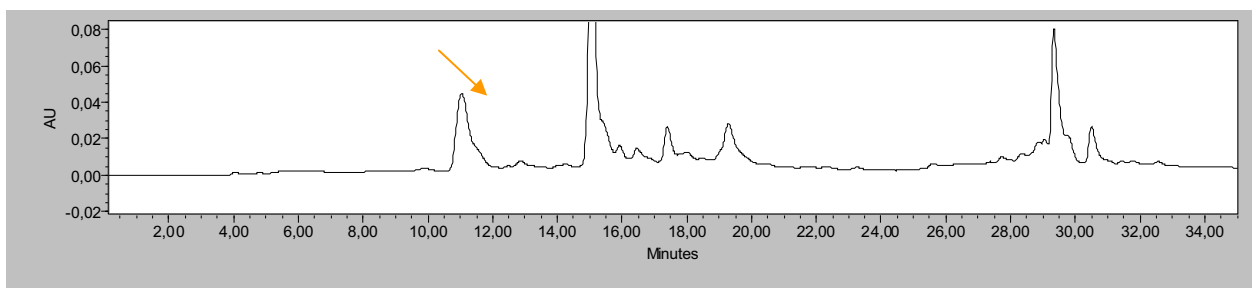
a) Referenz: 3-Hydroxybenzoesäure



b) Inkubation mit Rohextrakt aus elizitierten Zellkulturen



c) Inkubation mit denaturiertem Rohextrakt



d) Inkubation mit Rohextrakt aus nicht elizitierten Zellkulturen

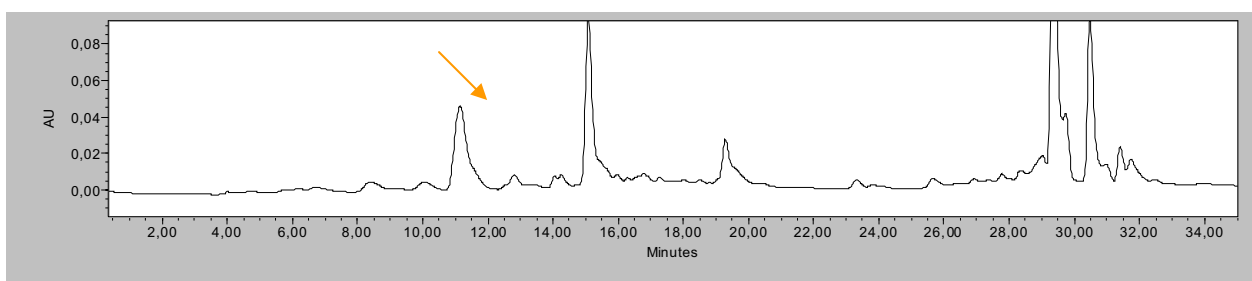


Abbildung 14: HPLC-Analyse von Shikimat-Dehydratase-Ansätzen

2 Klonierung von CoA-Ligasen aus *Sorbus aucuparia*

2.1 Allgemeines

Für *S. aucuparia* waren bereits zwei putative cDNA-Fragmente und ein vollständiger ORF für *p*-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL) bekannt (Ramadan, 2006). Ob diese Enzyme an der Biosynthese der Biphenyle beteiligt sind, sollte durch die Komplettierung der Fragmente sowie die heterologe Expression und Charakterisierung der Enzymaktivitäten ermittelt werden. Darüber hinaus wurde versucht, mit degenerierten Primern für hoch konservierte Bereiche bisher unbekannte Fragmente putativer CoA-Ligasen zu identifizieren.

Die Benennung der 4CLs aus *S. aucuparia* ist in dieser Arbeit analog den 4CLs aus *R. idaeus* gewählt.

2.2 Vergleich von Aminosäuresequenzen

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen 4CLs aus dikotylen Pflanzen ergibt eine Übereinstimmung von 50-75%. Unabhängig davon treten hoch konservierte Bereiche auf. Die prominentesten Motive werden als Box1 und Box2 bezeichnet. Das Box1 Motiv, SSGTTGLPKG_V, ist nicht absolut konserviert, findet sich aber mit hoher Ähnlichkeit auch bei Fettsäure:CoA-Ligasen, nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen, Luciferasen und Acetyl:CoA-Ligasen (Fulda et al., 1994). Das davon C-terminal gelegene Motiv Box2, GEICIRG, ist unter 4CLs deutlich höher konserviert. Daneben treten weitere hoch konservierte Bereiche auf [Abbildung 15]. So findet sich C-terminal der Box2 ein weiteres Motiv, GWLHTGDI, welches ebenfalls in Fettsäure:CoA-Ligasen und weiteren, so genannten 4CL-ähnlichen Proteinen, aufzufinden ist. Für die Fragmentsuche von Coenzym A-Ligasen wurden von Ramadan (2006) Box1- und Box2-entsprechende Primer abgeleitet.

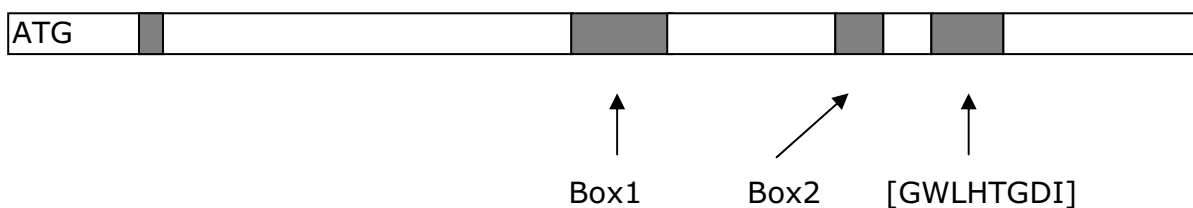


Abbildung 15: Konservierte Bereiche in 4CLs

2.3 Oligonukleotidsynthese

In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotide für die cDNA-Fragmentsuche von den hoch konservierten Regionen der Box1 und des Motivs GWLHTGDI abgeleitet [V.3.3]. Dabei entstand mit „Box1_4CL“ und „Anti 450aa“ ein von Box2 unabhängiges Primerpaar. Dadurch sollte die Möglichkeit eröffnet werden, 4CL-ähnliche DNA-Sequenzen amplifizieren zu können, die eine höhere Varianz im Box2 Motiv tragen.

2.4 Gewinnung von CoA-Ligase-cDNA-Fragmenten

Für die Gewinnung von cDNA-Fragmenten von CoA-Ligasen wurde zunächst poly(A⁺)-RNA aus Zellkulturen von *S. aucuparia* gewonnen [V.3.4.1]. Dabei wurde der Zeitpunkt für die poly(A⁺)-RNA-Isolierung so gewählt, dass von einer vermehrten Expression der Enzyme für die Biphenyl-Biosynthese ausgegangen werden konnte (Liu et al., 2004). Diesem Anstieg der Enzymaktivitäten geht eine Konzentrationssteigerung auch des gesuchten Transkripts in der gesamten poly(A⁺)-RNA-Population voraus. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Amplifikation. Die Biosynthese der Biphenyle wurde durch Zugabe von Methyljasmonat am fünften Tag des Zellkulturwachstums induziert und 15 h später die poly(A⁺)-RNA gewonnen. Die präparierte poly(A⁺)-RNA wurde mittels reverser Transkription mit einem oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben [V.3.5.2].

Die gewonnene cDNA wurde für eine PCR mit den degenerierten Primern eingesetzt [V.3.6]. Als Anlagerungstemperatur für die degenerierten Primer wurde 52 °C gewählt. Das Produkt der PCR wurde für eine zweite Amplifikation mit dem gleichen Primerpaar verwendet. Es konnten Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe (~700 bp) gefunden werden.

2.5 Klonierung, Sequenzierung und Datenbankvergleich

Die gewonnenen Amplifikationsprodukte wurden in den pGEM-T easy-Vektor kloniert [V.3.9.1] und nach Vermehrung und Plasmidisolierung anschließend sequenziert [V.3.14]. Die erhaltenen Informationen über die DNA-Sequenzen wurden mit einer Datenbank abgeglichen [V.3.15]. Dabei konnten drei unterschiedliche Fragmente identifiziert werden. Bei diesen Fragmenten handelte es sich um die schon bekannten Fragmente der putativen 4CL-Isoformen aus

S. aucuparia. Von diesen lag *Sa4CL3* bereits als vollständiger ORF vor (Ramadan, 2006).

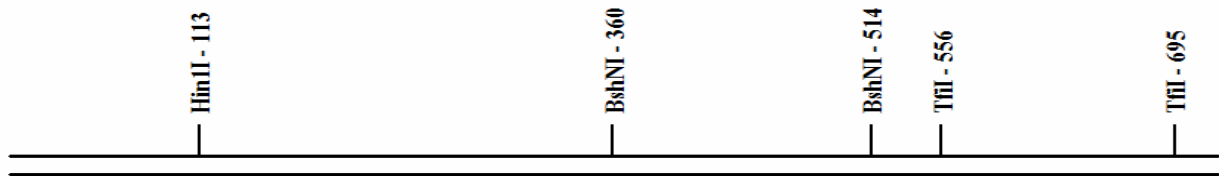
Die *Sa4CL*-Isoformen zeigen eine hohe Identität mit den 4CL-Isoformen aus *Rubus idaeus* (Kumar und Ellis, 2003). Von diesen weist *Ri4CL2*, bezogen auf die Umsetzung von *p*-Cumarsäure (100%), eine ungewöhnlich hohe relative Aktivität gegenüber Zimtsäure auf (153%). Da auf Aminosäurenebene eine hohe Identität zwischen den Fragmenten der *Sa4CL2* und *Ri4CL2* zu beobachten war (94%), lag das Hauptaugenmerk auf der Vervollständigung dieser cDNA. Eine bevorzugte Aktivierung der Zimtsäure könnte einen Hinweis auf die Biosynthese von Benzoyl-CoA über den CoA-abhängigen, β -oxidativen Weg und damit auch auf die Biosynthese der Biphenyle geben [I.3.1].

2.6 Screening von Amplifikationsprodukten

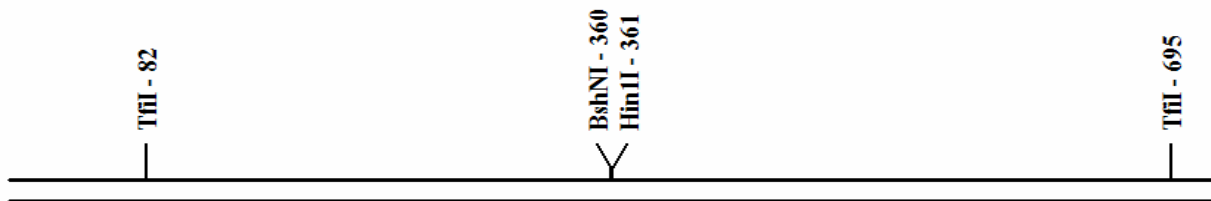
Der Bereich zwischen den gewählten Primern ist bei cDNA-Sequenzen verschiedenster CoA-Ligasen von einheitlicher Größe. Daher können bei der PCR mit degenerierten Primern individuelle Amplifikate mit gleicher oder sehr ähnlicher Länge generiert werden. Bei der Gelelektrophorese auf Agarosegelen [V.3.7] erscheint so nur eine Bande. Erst durch Klonierung kommt es zur Selektion des individuellen Amplifikats und es ist eine eigenständige Identifizierung möglich. Um möglichst viele Amplifikationsprodukte analysieren zu können, wurde ein Restriktionsverdau für DNA-Fingerprints gewählt [V.3.8.1], der eine zeitsparende und kostengünstige Alternative zur DNA-Sequenzierung darstellt.

Dazu wurden die Amplifikationsprodukte in einen T-Überhangvektor ligiert [V.3.9.1] und in *E. coli* DH5 α transferiert [V.3.10.1]. Daraus isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Endonukleasen *BshNI*, *Hin1I* und *TfiI* verdaut. Das entstandene Restriktionsmuster wurde gleich behandelten cDNA-Fragmenten der bekannten *Sa4CL*-Isoformen verglichen. Eine Übersicht über die Restriktionsschnittstellen der bekannten Fragmente von *Sa4CL*-Isoformen und des verwendeten Vektors geben Abbildung 16 und Abbildung 17.

a) Restriktionsschnittstellen im Fragment Sa4CL1



b) Restriktionsschnittstellen im Fragment Sa4CL2



c) Restriktionsschnittstellen im Fragment Sa4CL3



Abbildung 16: Restriktionsschnittstellen in cDNA-Fragmenten

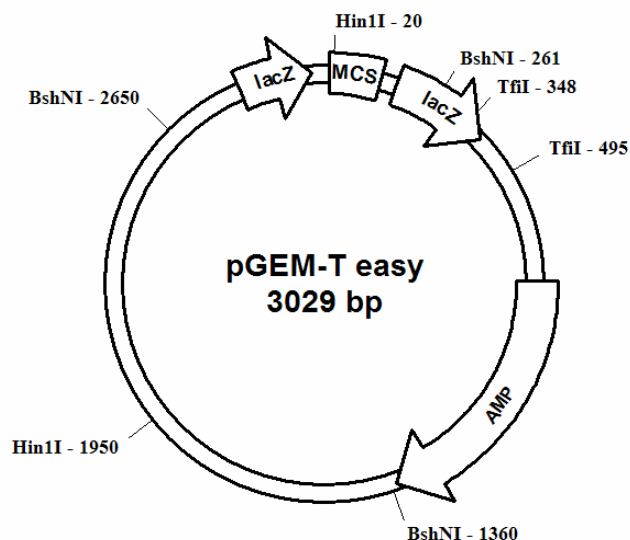


Abbildung 17: Restriktionsschnittstellen im pGEM-T easy-Vektor

Mit diesem Verfahren wurden ca. 250 individuelle Amplifikate analysiert. Wurden Abweichungen von den bekannten Restriktionsmustern erkannt, so wurde das entsprechende Plasmid sequenziert. In keinem der untersuchten Fälle konnte jedoch ein abweichendes cDNA-Fragment gefunden werden. Mit der gewählten PCR-Methode wurden so scheinbar ausschließlich Fragmente der Sa4CL-Isoformen gewonnen.

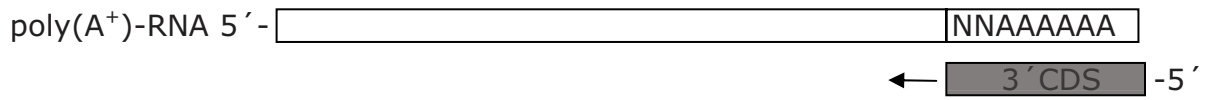
Der Grund dafür kann aus dem Verfahren der PCR selbst erklärt werden. Bei der PCR mit degenerierten Primern werden bevorzugt solche DNA-Fragmente amplifiziert, die aufgrund hoher Identität eine günstige Hybridisierungswahrscheinlichkeit mit den Primern zeigen. Durch die exponentielle Vervielfältigung während der PCR sind solche Fragmente im Ergebnis überrepräsentiert. Da sich die eingesetzten Primer maßgeblich von Sequenzen verschiedener 4CLs ableiten, sind vor allem cDNA-Fragmente von 4CLs aus der PCR zu erwarten.

2.7 Gewinnung der vollständigen Sa4CL2-cDNA

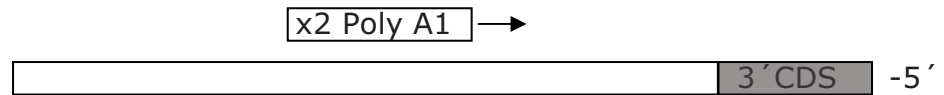
Für die Gewinnung der kompletten Sa4CL2-cDNA wurde das RACE-Verfahren angewendet [V.3.6.1]. Dabei konnte zunächst der vollständige 3'-Terminus identifiziert werden.

Dazu wurde poly(A⁺)-RNA mittels 3'CDS-Primer in cDNA umgeschrieben [V.3.5.1]. Für die erste anschließende PCR wurden der 3'CDS-Primer selbst und ein genspezifischer Primer verwendet [Abbildung 18]. Darauf folgte eine zweite Amplifikation mit einem zweiten innerhalb des Amplifikats gelegenen genspezifischen Primer und wiederum dem 3'CDS-Primer (nested PCR). Es wurde eine „Touch-down“-PCR durchgeführt. Dabei wurde mit einer Anlagerungs-Temperatur von 60 °C begonnen und in den folgenden 10 Zyklen die Temperatur um jeweils 0,5 °C gesenkt. Es folgten 25 Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C.

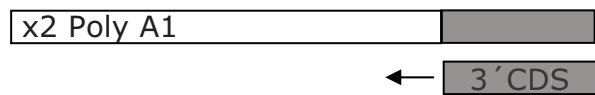
a) cDNA-Synthese



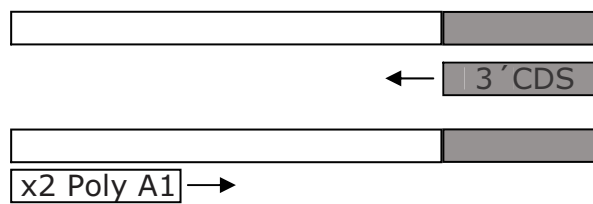
b) 3'-RACE PCR (erster Zyklus)



c) 3'-RACE PCR (Folgezyklus)



d) 3'-RACE PCR (Restzyklen)



e) Zweite Amplifikation

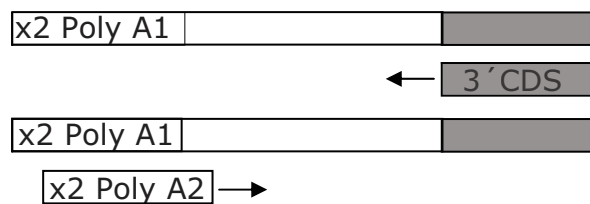


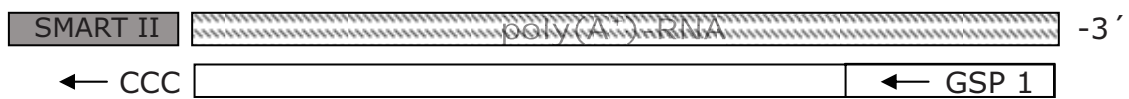
Abbildung 18: 3'-RACE

Für das cDNA-Fragment von *Sa4CL1* konnte nach dem gleichen Verfahren der 3'-Terminus identifiziert werden. Dazu wurden die entsprechenden genspezifischen Primer x1 Poly A1/A2 verwendet. Die 3'-Termini von *Sa4CL1* und *Sa4CL2* konnten erstmals komplett identifiziert werden.

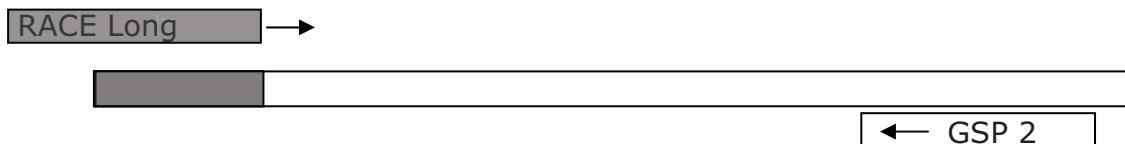
Um den 5'-Terminus von *Sa4CL2* aufzuklären wurde das 5'-RACE Verfahren angewendet. Dazu wurde zunächst poly(A⁺)-RNA von *S. aucuparia* mit Hilfe eines strangaufwärts gerichteten genspezifischen Primers in cDNA revers transkribiert [Abbildung 19]. Bei dieser Reaktion wurde zusätzlich der SMART II-Primer verwendet.

Bei der reversen Transkription mit der PowerScript RT (Clontech) werden von dieser am 3'-Ende des neu synthetisierten cDNA-Erststrangs mehrere Desoxycytidinreste angeknüpft [V.3.5.1]. Durch Anlagerung des SMART II-Primers an diesen Überhang wird die poly(A⁺)-RNA um eine bekannte Ankersequenz verlängert. Die cDNA-Erststrangsynthese schließt so mit der komplementären SMART II-Primersequenz ab. Die folgende PCR wurde als nested PCR mit einem weiter strangaufwärts gelegenen genspezifischen Primer und dem RACE-Long-Primer durchgeführt. Von dem Produkt wurden 0,5 µl für eine zweite Amplifikation mittels nested PCR verwendet. Dazu wurden der RACE-Short-Primer und ein dritter genspezifischer Primer eingesetzt.

a) cDNA-Erststrangsynthese



b) Erste Amplifikation



c) Zweite Amplifikation

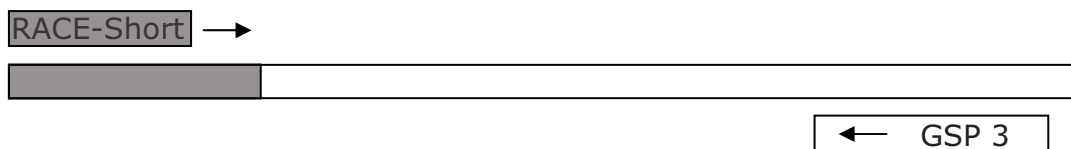


Abbildung 19: 5'-RACE

Nach dieser Methode konnte zunächst eine Verlängerung um 400 bp erreicht werden. Dazu wurden die genspezifischen Primer x2 5-3, x2 5-4 und x2 5-5 eingesetzt. Der vollständige 5'-Terminus konnte dann mit den genspezifischen Primern x2 5-9, x2 5-10 und x2 5-11 amplifiziert werden.

Der ORF von *Sa4CL2* umfasst 1644 bp und kodiert für 547 Aminosäuren. Auf Nukleotidebene weist der ORF eine Identität von 57-80% mit *Sa4CL3* und den *Ri4CL*-Isoformen auf. Die höchste Identität zeigt sich im Vergleich mit *Ri4CL2*. Tabelle II-1 gibt die prozentuale Identität auf Aminosäurenebene wieder.

Tabelle II-1: Aminosäuresequenz-Identität von 4CLs aus *S. aucuparia* und *R. idaeus* [%]

	1	2	3	4	5	
1		62,6	71,5	87,5	60,9	<i>Sa4CL2</i>
2			63,2	64,0	74,4	<i>Sa4CL3</i>
3				71,5	60,2	<i>Ri4CL1</i>
4					61,9	<i>Ri4CL2</i>
5						<i>Ri4CL3</i>

2.8 Klonierung in den Expressionsvektor pRSET B

Um das durch den *Sa4CL2*-Klon kodierte Protein heterolog zu exprimieren, musste zunächst der ORF fehlerfrei aus cDNA amplifiziert werden. Dazu wurden die Expressionsprimer Exp-x2 3 XhoI und Exp-x2 5 NheI synthetisiert und in einer PCR mit der korrekturlesenden *Pfu*-Polymerase eingesetzt [V.3.6]. Als Matrize wurde eine poly(A⁺)-RNA mit dem 5' CDS-Primer in cDNA umgeschrieben. Da nach einmaliger PCR mit 30 Zyklen keine Amplifikate auf dem Agarosegel zu erkennen waren, wurden von dem ersten PCR-Ansatz 0,5 µl für eine zweite Amplifikation unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Der dann fehlerfrei erhaltene ORF wurde mit den Endonukleasen XhoI und NheI parallel verdaut. Der ORF selbst wies diese Schnittstellen nicht auf. Durch die Verwendung von Schnittstellen in den Expressionsprimern konnten klebrige Enden an den jeweiligen Flanken des ORF geschaffen werden. Der Expressionsvektor pRSET B wies in der MCS die gleichen Schnittstellen auf, so dass eine gerichtete Ligation in den Vektor vorgenommen werden konnte [Abbildung 20]. Nach Restriktion von ORF und Expressionsvektor wurden beide Komponenten des Expressionskonstrukts durch T4-DNA-Ligase verbunden [V.3.9.2]. Dieses Konstrukt wurde zunächst in *E. coli* DH5α transferiert und vermehrt. Es folgten Plasmidisolierung und Kontrollsequenzierung. Das überprüfte Plasmid wurde abschließend in *E. coli* BL21(DE3)pLysS transferiert.

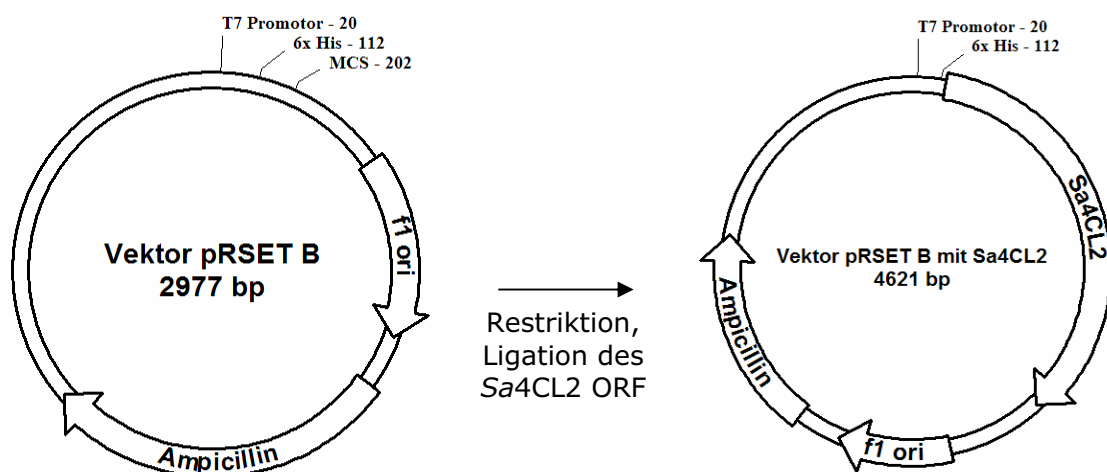


Abbildung 20: Konstruktion des Expressionsvektors für *Sa4CL2*

2.9 Heterologe Expression von Sa4CL2

Um die enzymatische Aktivität von *Sa4CL2* nachweisen und charakterisieren zu können, musste das Protein heterolog exprimiert werden. Nachdem das Vektorkonstrukt in BL21(DE3)pLysS transferiert wurde, konnte die Expression durch IPTG-Induktion der T7-RNA-Polymerase gestartet werden [V.3.13]. Das über Nacht exprimierte Protein konnte durch Ultraschall-Lyse aus den Bakterienzellen freigesetzt werden und wurde anschließend direkt für Aktivitätsbestimmungen eingesetzt. *Sa4CL3* (Ramadan, 2006) wurde als Kontrolle unter gleichen Bedingungen heterolog exprimiert. Für die Charakterisierung von *Sa4CL2* wurde das heterolog exprimierte Enzym über Affinitätschromatographie gereinigt [V.2.5]. Heterolog exprimiertes *Sa4CL2* trug N-terminal einen Polyhistidinrest. Die kodierende Sequenz war der MCS im Expressionsvektor vorgeschaltet und trug ein eigenständiges Startcodon (ATG). Die Translation des resultierenden Fusionsproteins (His-4CL) wurde jedoch erst durch das Stoppcodon des eingefügten ORF terminiert.

2.10 Aktivitätsüberprüfung rekombinanter Sa4CL-Isoformen

Sa4CL2 wurde nach heterologer Expression zunächst aus dem bakteriellen Rohextrakt heraus auf enzymatische Aktivität untersucht [V.2.6]. Als Positivkontrolle diente *Sa4CL3* (Ramadan, 2006) und für die Untersuchung auf Aktivität mit Benzoessäure eine bakterielle Benzoat:CoA-Ligase (BZL) (Beuerle und Pichersky, 2002). Als negative Kontrolle wurde der identische Expressionsvektor mit einem ORF für Benzophenon-Synthase (BPS) aus *H. androsaemum* (Liu et al., 2003) verwendet. Es zeigte sich ein für 4CLs typisches Substratspektrum [Tabelle II-2].

Tabelle II-2: Substratverwertung durch Sa4CLs und Kontrollproteine

Substrat	Sa4CL2	Sa4CL3	BZL	BPS
<i>p</i> -Cumarsäure	+	+	-	-
Zimtsäure	+	+	-	-
Kaffeesäure	+	+	-	-
Ferulasäure	+	+	-	-
Sinapinsäure	-	-	-	-
Benzoessäure	-	-	+	-

Abweichend von Ramadan (2006) konnte für Sa4CL3 keine Umsetzung von Benzoessäure zu Benzoyl-CoA gefunden werden. Das selbe gilt für Sa4CL2. In den Reaktionsansätzen mit radioaktiv markiertem Substrat [V.2.6.1] konnte nach einer Inkubationszeit von 30 min keine Radioaktivität in der wässrigen Phase der extrahierten Ansätze detektiert werden. Das Ergebnis entsprach der Negativkontrolle. Der extrahierte Ansatz der Positivkontrolle mit bakterieller BZL zeigte deutliche Radioaktivität im Szintillationszähler, ausgedrückt in counts per minute (cpm) [Tabelle II-3].

Die Versuche mit radioaktiv markierter Benzoessäure wurden ebenfalls mit gereinigten rekombinanten Sa4CLs durchgeführt. Das Ergebnis blieb unverändert.

Tabelle II-3: In Enzymsätzen detektiertes radioaktives Benzoyl-CoA [cpm]

Inkubation	Sa4CL2	Sa4CL3	BZL	BPS
nativ	45	47	3800	44
denaturiert (100 °C, 5 min)	48	44	312	40

2.11 Charakterisierung von Sa4CL2

Für die Charakterisierung von Sa4CL2 wurde das heterolog exprimierte Fusionsprotein His-Sa4CL2 über Affinitätschromatographie gereinigt [V.2.5] und der Proteingehalt der gewonnenen Lösungen bestimmt [V.2.8]. Eine Reinheitskontrolle wurde mit Hilfe der SDS-PAGE durchgeführt.

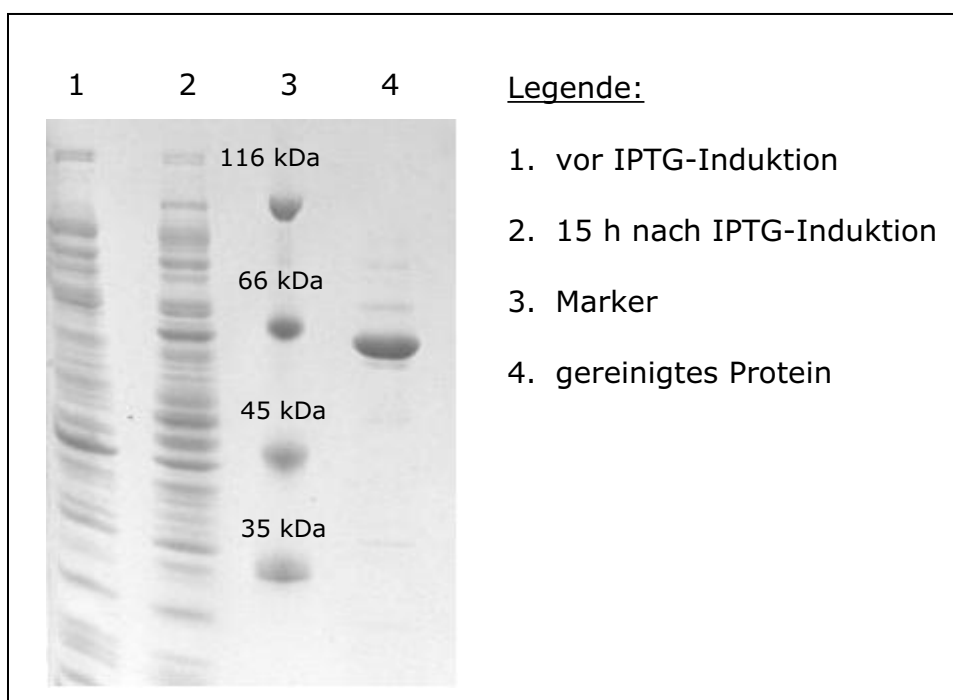


Abbildung 21: Kontrolle der Aufreinigung von rekombinantem Sa4CL2 mittels SDS-PAGE

2.11.1 Molekülmasse

Aus der Aminosäuresequenz des translatierten ORF ließ sich für Sa4CL2 eine Molekülmasse von 60,15 kDa errechnen [V.2.11]. Mittels SDS-PAGE wurde eine relative Molekülmasse der gereinigten His-Sa4CL2 von 62 kDa ermittelt [V.2.9]. Darüber hinaus wurde die relative Molekülmasse mittels Gelfiltration bestimmt [V.2.10]. Dazu wurde eine Kalibrierung mit folgenden Proteinen bekannter Molekülmassen durchgeführt: Cytochrom c (12,5 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), Ovalbumin (45 kDa), BSA (66 kDa) und Aldolase (147 kDa) [Abbildung 22]. In einem zweiten Durchgang wurde BSA aus der Mischung durch His-Sa4CL2 ersetzt und die relative Molekülmasse der Sa4CL2 anhand der Kalibriergeraden bestimmt. Aus der Funktion der Kalibriergeraden und der Retention des gesuchten

Proteins konnte eine relative Molekülmasse von 61,5 kDa berechnet werden. Damit liegt *Sa4CL2* als Monomer vor.

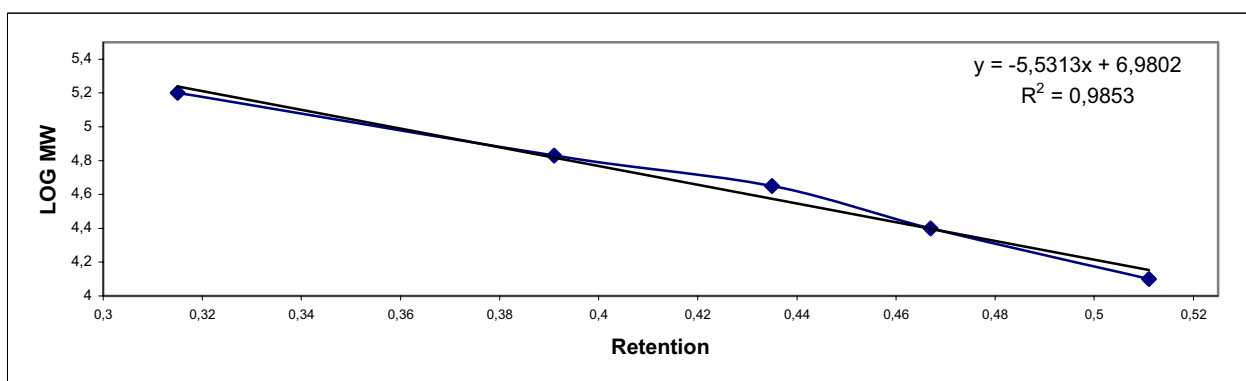


Abbildung 22: Kalibriergerade zur Bestimmung der relativen Molekülmasse mittels Gelfiltration

2.11.2 Enzymkinetik

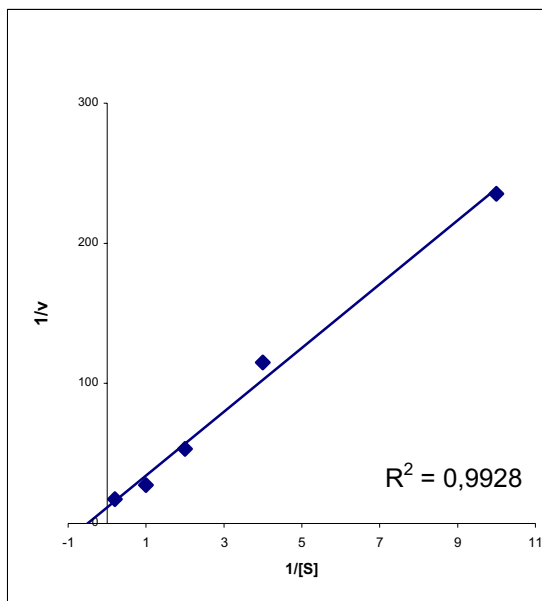
Die kinetischen Daten für *Sa4CL2* wurden mit Hilfe eines photometrischen Tests bestimmt [V.2.7]. Wichtige Parameter der Enzymkinetik sind die Michaelis-Konstante K_M , die Maximalgeschwindigkeit V_{max} und die sich daraus auf Basis der Proteinkonzentration ergebende Wechselzahl K_{cat} . K_M ist die Substratkonzentration, bei der V die Hälfte des Maximalwerts erreicht, und ein Maß für die Affinität des Enzyms zu einem Substrat. Ist K_M bei einem hohen Wert für K_{cat} klein, so liegt eine hohe katalytische Effizienz vor (K_{cat}/K_M). K_M lässt sich graphisch exakter durch eine Linearisierung der Michaelis-Menten-Kurve bestimmen. Dazu wird der reziproke Wert der Umsatzgeschwindigkeit v über den reziproken Wert der Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen. Man erhält den Lineweaver-Burk-Plot. Der Abszissenschnittpunkt gibt $1/K_M$ wieder.

Bei der Bestimmung von kinetischen Parametern ist darauf zu achten, dass ein untersuchtes Substrat während der Messung nicht als limitierender Faktor wirkt. Um dieses zu gewährleisten, müssen möglichst geringe Enzymkonzentrationen eingesetzt und der Messzeitraum kurz gehalten werden. Dabei muss dennoch auf eine ausreichende Quantifizierbarkeit des Messsignals geachtet werden. Übrige Komponenten des Ansatzes werden im Überschuss eingesetzt.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden jeweils $4 \mu\text{g}$ des affinitätsgereinigten Enzyms verwendet. Es wurde ein Ansatz mit einem Volumen von 1 ml durchgeführt [V.2.6].

Die Lineweaver-Burk-Diagramme für die Bestimmung von K_M und V_{max} der einzelnen Substrate sind in Abbildung 23 dargestellt. Die kinetischen Parameter sind in Tabelle II-4 zusammengefasst.

a) *p*-Cumarsäure



b) Zimtsäure

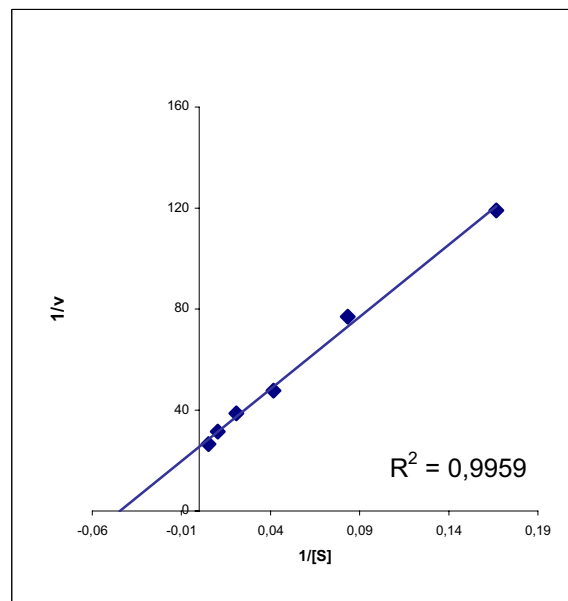
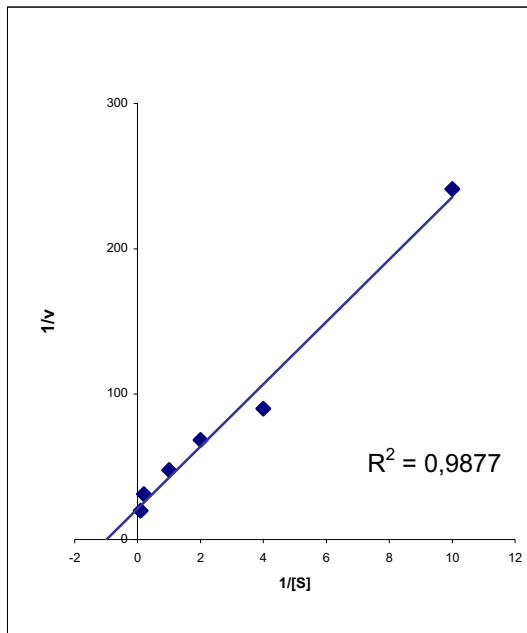
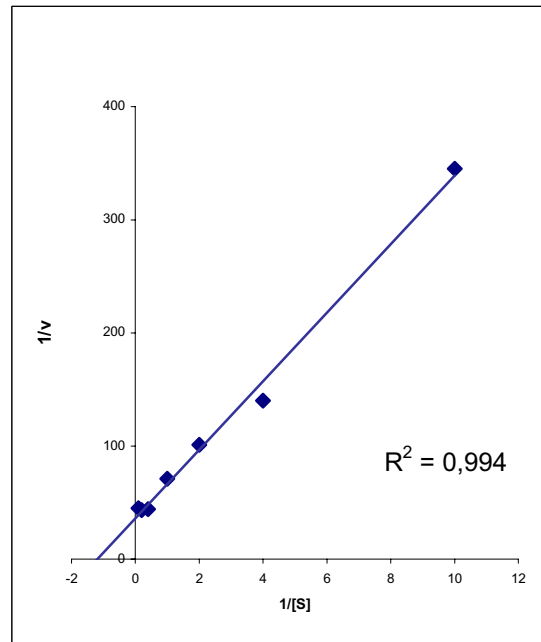


Abbildung 23: Bestimmung kinetischer Parameter mittels Lineweaver-Burk-Diagramme (Teil 1)

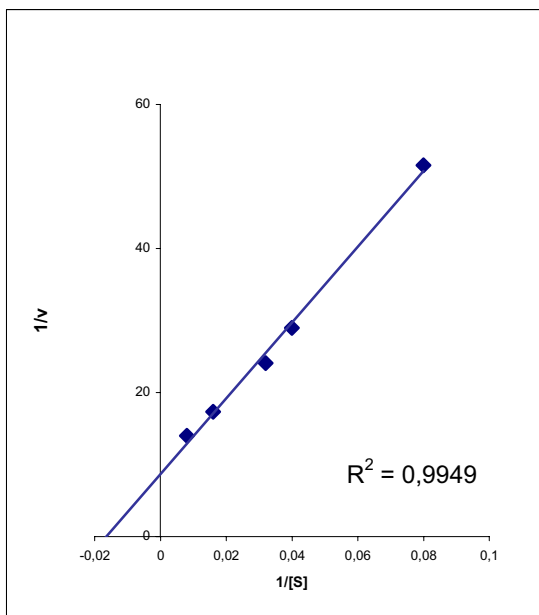
c) Ferulasäure



d) Kaffeesäure



e) ATP



f) Coenzym A

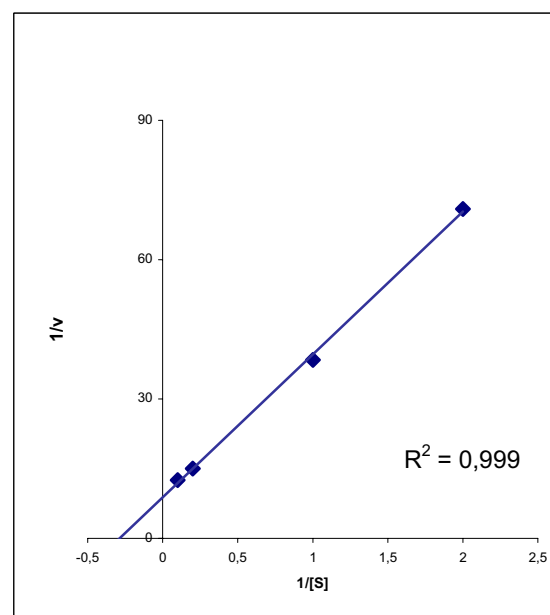


Abbildung 23: Bestimmung kinetischer Parameter mittels Lineweaver-Burk-Diagramme (Teil 2)

Tabelle II-4: Übersicht der kinetischen Parameter von Sa4CL2

Substrat	K_M [μM]	V_{max} [nkat/mg]	K_{cat} [1/s]	K_{cat}/K_M [1/s * μM]
<i>p</i> -Cumarsäure	2,53	9,644	0,58	0,23
Zimtsäure	23,17	4,915	0,29	0,01
Kaffeensäure	0,88	5,972	0,36	0,41
Ferulasäure	0,95	5,618	0,34	0,36

Sa4CL2 zeigte die niedrigsten K_M -Werte für Kaffeensäure und Ferulasäure. Die Affinität gegenüber *p*-Cumarsäure war um den Faktor 2,5 geringer, gegenüber Zimtsäure um den Faktor 25. Die höchste Umsatzgeschwindigkeit wurde mit *p*-Cumarsäure erreicht. Die katalytische Effizienz war für Kaffeensäure und Ferulasäure am höchsten. Damit deuteten die K_M -Werte und übrigen kinetischen Parameter auf eine Beteiligung der Sa4CL2 an der Ligninbiosynthese hin. Eine Beteiligung an der Flavonoid-Biosynthese sollte im Gegensatz dazu durch eine höhere katalytische Effizienz mit *p*-Cumarsäure gekennzeichnet sein.

Der K_M -Wert für ATP betrug 55 μM , der für Coenzym A 4 μM . Sinapinsäure und Benzoessäure wurden nicht als Substrate akzeptiert. Eine Zusammenfassung der Substratspezifität von Sa4CL2, ausgedrückt als katalytische Effizienz relativ zu *p*-Cumarsäure gibt Abbildung 24.

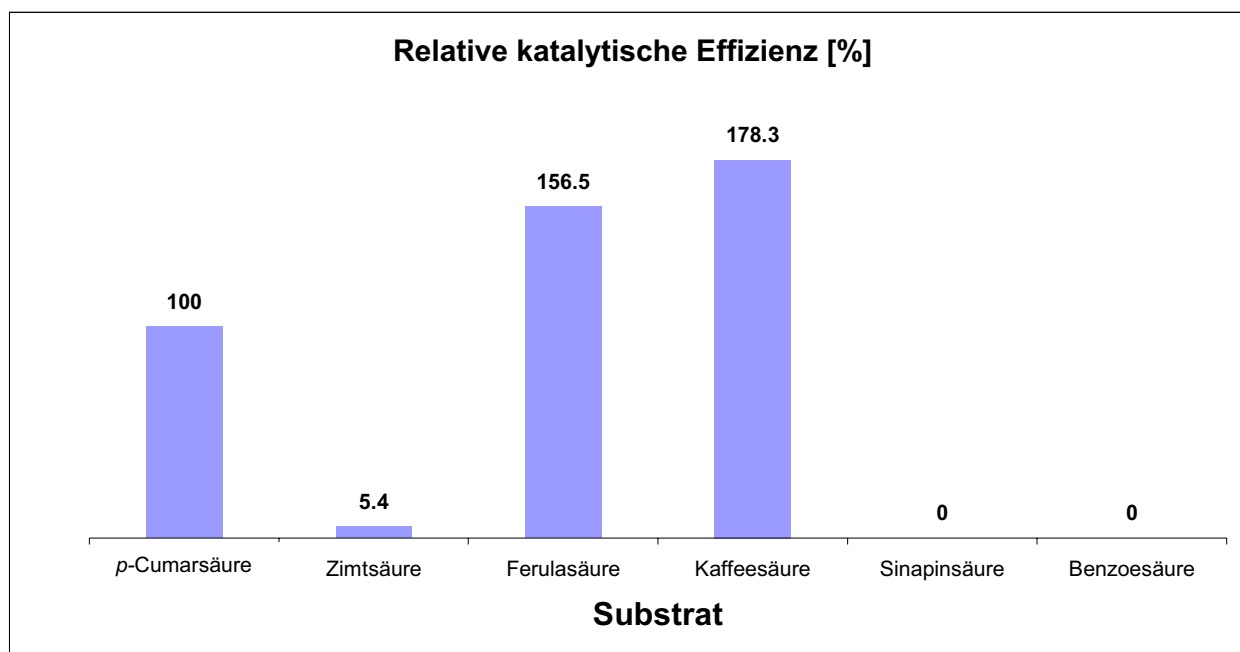


Abbildung 24: Relative katalytische Effizienz von Sa4CL2, bezogen auf *p*-Cumarsäure (100%)

2.11.3 Temperaturoptimum (optimale Umsatztemperatur)

Enzymatische Reaktionen sind temperaturabhängig. Eine effiziente Katalyse ist mit einer optimalen Faltung der Proteine verbunden. Durch unterschiedliche Temperaturen kann diese Faltung beeinflusst werden. Dabei spielt beispielsweise die thermische Beweglichkeit für die Stabilität der Tertiärstruktur der Proteine eine Rolle.

Das Temperaturoptimum für Sa4CL2 wurde durch Aktivitätsmessungen [V.2.6] bei Temperaturen von 25-50 °C bestimmt. Dazu wurde jeweils in einem Intervall von 5 °C die Aktivität überprüft. Das Temperaturoptimum für Sa4CL2 lag bei 35-40 °C [Abbildung 25].

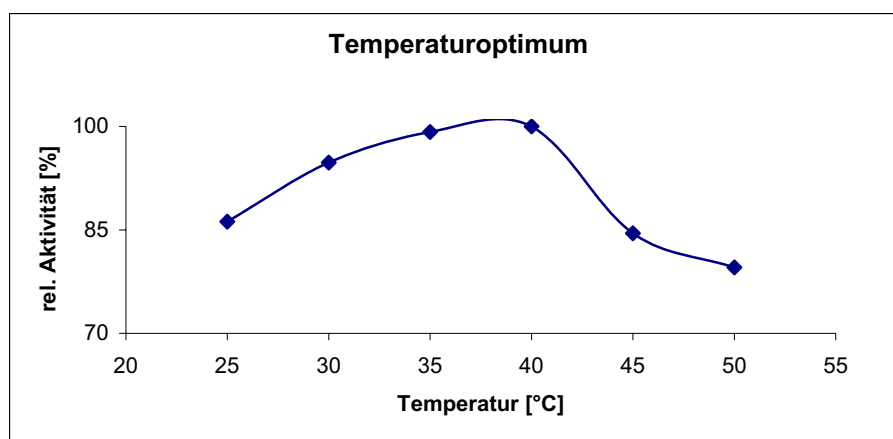


Abbildung 25: Temperaturoptimum von Sa4CL2

2.11.4 pH-Optimum

Ebenso wie die Temperatur beeinflusst der pH-Wert die Aktivität von Enzymen. Die Aminosäurenreste in Proteinen können neben neutralen auch saure oder basische Strukturbereiche aufweisen. Diese können abhängig vom pH-Wert dissoziiert oder protoniert vorliegen. Somit haben sie z.B. einen Einfluss auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit auf die Tertiärstruktur der Enzyme und ihre Substratbindung.

Das pH-Optimum für *Sa4CL2* wurde mittels Aktivitätsbestimmungen in Pufferlösungen unterschiedlichen pH-Werts (pH 6,0-8,5) ermittelt. Es wurden Messungen in einem Intervall von jeweils 0,5 pH-Einheiten durchgeführt. Das pH-Optimum für *Sa4CL2* lag um pH 7,5 [Abbildung 26].

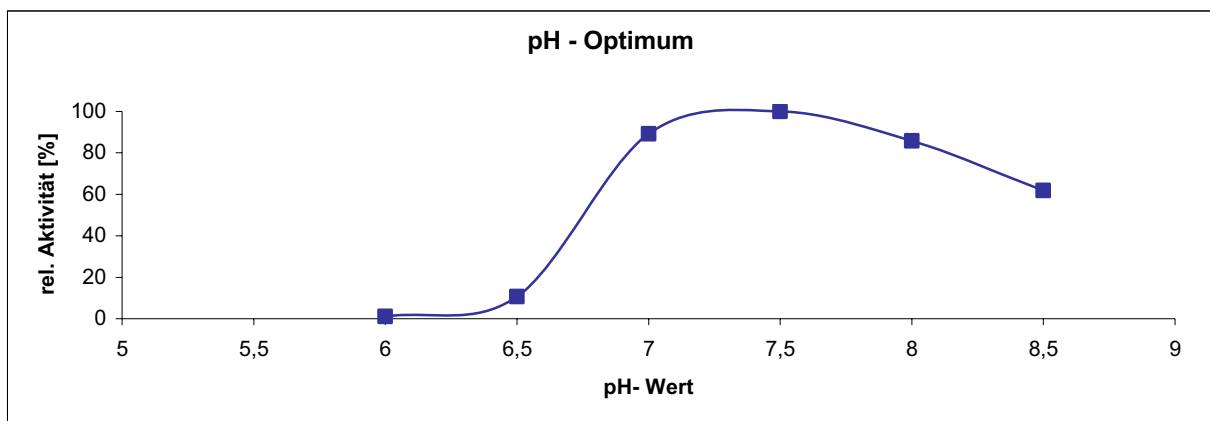


Abbildung 26: pH-Optimum von *Sa4CL2*

2.11.5 Cofaktoren

Die Aktivität von *p*-Cumarat:CoA-Ligasen ist abhängig von zweiwertigen Kationen. Zwar wird Magnesium häufig in Standard-Ansätzen eingesetzt, doch kann auch mit anderen divalenten Kationen Aktivität beobachtet werden (Knobloch und Hahlbrock, 1975; Pietrowska-Borek et al., 2003).

Sa4CL2 wurde mit unterschiedlichen zweiwertigen Kationen getestet. Die höchste Aktivität konnte mit Mangan erzielt werden, während in Gegenwart von Kupfer und Zink keine Aktivierung von *p*-Cumarsäure stattfand [Abbildung 27].

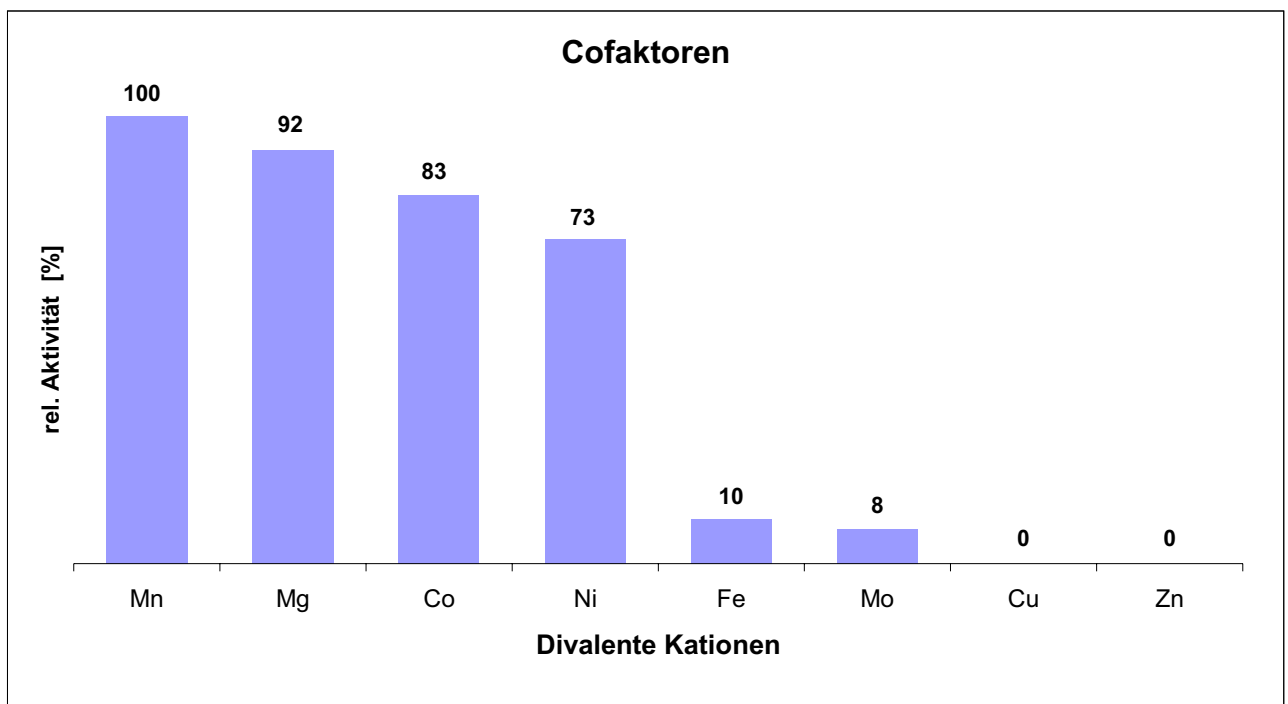


Abbildung 27: Einfluss von Cofaktoren auf die Aktivität von *Sa4CL2*

2.12 Identifizierung des enzymatisch gebildeten Produkts

Das durch Sa4CL2 aus *p*-Cumarsäure und Coenzym A gebildete Produkt wurde über Festphasenextraktion gereinigt [V.2.6.2] und mit Hilfe der Massenspektrometrie bestätigt [V.5.3]. Dazu wurde zunächst die Reinheit der Probe im Q1+ -Experiment über einen Massenbereich von 300-1000 amu überprüft. Neben der dominanten Masse m/z 914 $[M+H]^+$ des *p*-Cumaroyl-CoA war auch die Masse des Coenzym A m/z 768 $[M+H]^+$ zu erkennen [Abbildung 28].

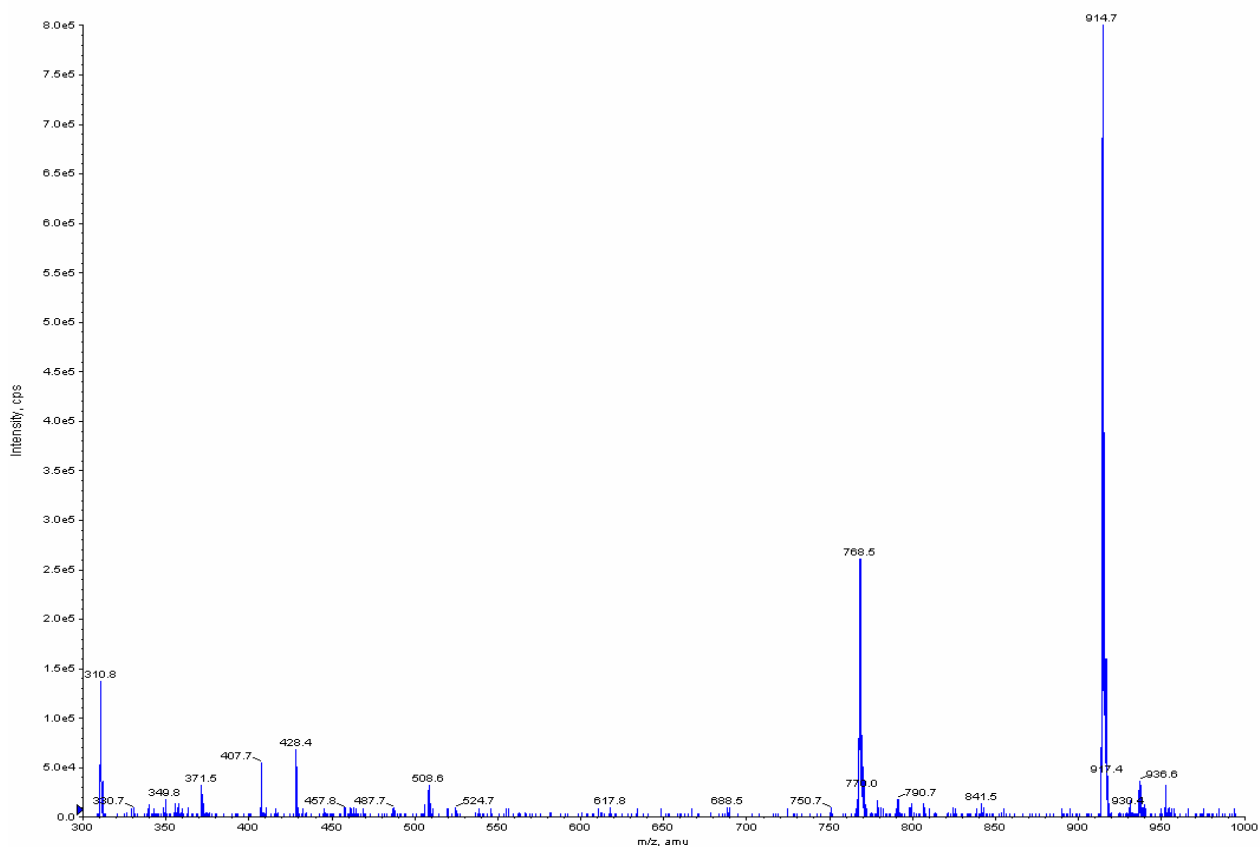


Abbildung 28: Massenspektrum (Q1+) von gereinigtem *p*-Cumaroyl-CoA

Im EPI+ -Experiment wurde die Masse m/z 914 selektiert und weiter fragmentiert. Das MS/MS-Spektrum [Abbildung 29] zeigte neben dem Molekülion m/z 914 $[M+H]^+$ die Fragmentationen m/z 768 $[M - p\text{-Cumarat} + H]^+$, m/z 508 $[M - p\text{-Cumaroylpantethein} + H]^+$, m/z 505 $[M - \text{Adenosin-3',5'-diphosphat} + H]^+$ und m/z 428 $[M - p\text{-Cumaroylpantetheinphosphat} + H]^+$. Diese Fragmentierungen sind in Abbildung 30 wiedergegeben. Für das dominante Fragmentation m/z 407 konnte die Struktur in Abbildung 31 postuliert werden. Formal ließe sich diese aus einem Bindungsbruch zwischen Pantethein und Phosphat unter Ausbildung eines protonierten Tetrahydropyrrols darstellen. Das Fragmentation m/z 407 wurde durch ein äquivalentes EPI+ -Experiment mit Feruloyl-CoA bestätigt, wobei das Fragmentation der Masse m/z 437 auftrat. Dieses ergab sich aus der Massendifferenz von 30 Da durch die zusätzliche Methoxyfunktion der Ferulasäure am aromatischen Ring.

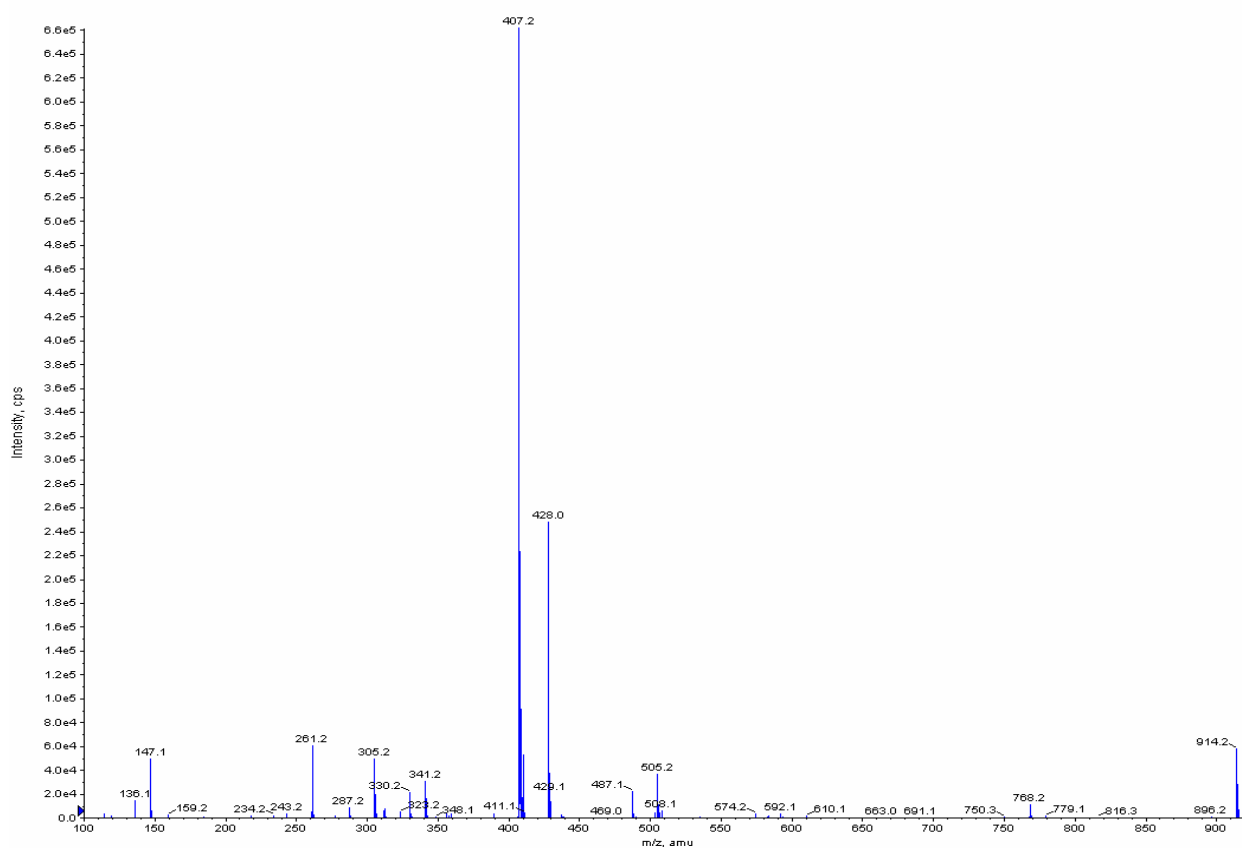


Abbildung 29: MS/MS-Spektrum (EPI+) von gereinigtem *p*-Cumaroyl-CoA

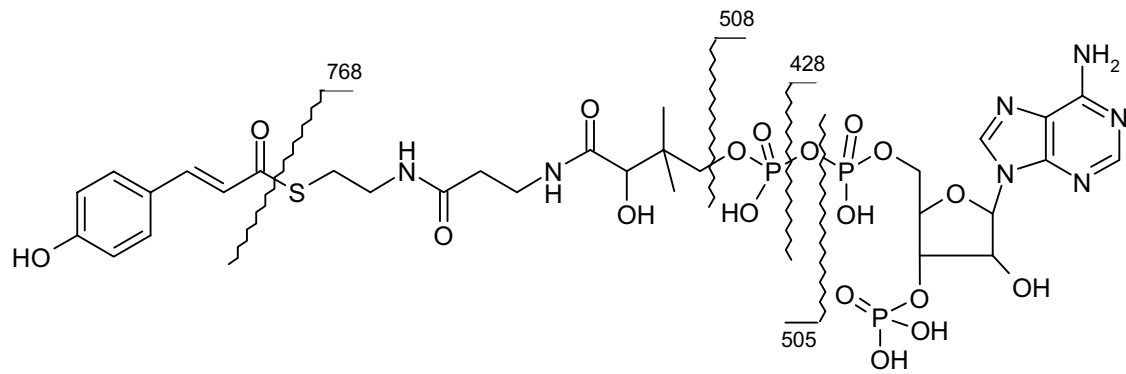


Abbildung 30: Vorgeschlagene Fragmentierungen für *p*-Cumaroyl-CoA

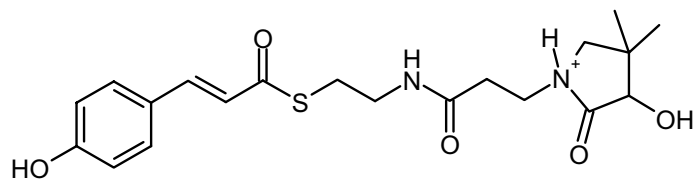


Abbildung 31: Postulierte Struktur des Fragmentions *m/z* 407

2.13 Klonierungsversuche von Ri4CL2

Die Ergebnisse der Charakterisierung von *Sa4CL2* widersprachen den veröffentlichten Daten von *Ri4CL2* (Kumar und Ellis, 2003). Die für *Ri4CL2* beschriebene hohe relative Aktivität mit Zimtsäure konnte trotz der hohen Identität auf Aminosäurenebene (86%) für *Sa4CL2* nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde versucht, den ORF von *Ri4CL2* zu klonieren, um eine Charakterisierung des Enzyms unter äquivalenten Bedingungen vorzunehmen.

Dazu wurde eine Suspensionskultur von *Rubus idaeus* angelegt [V.1.1]. Diese diente als Quelle für gesamt- und poly(A⁺)-RNA-Präparationen. Aus der bekannten cDNA-Sequenz von *Ri4CL2* (AF239686) wurden genspezifische Primer zur Gewinnung des vollständigen ORFs abgeleitet. Klonierungsversuche aus mit Chitosan elizitierten und unbehandelten Zellkulturen waren erfolglos. Die Ursache kann in einer zu geringen Transkription des entsprechenden Gens in den Zellkulturen vermutet werden. Damit war ein direkter Vergleich der rekombinanten Enzyme *Ri4CL2* und *Sa4CL2* nicht möglich. Von einer Aktivitätsüberprüfung aus zellfreiem Extrakt der Suspensionskulturen wurde abgesehen, da eine Überlagerung der Aktivitäten der drei *Ri4CL*-Isoformen zu erwarten gewesen wäre.

2.14 Expressionsanalyse von Sa4CL-Isoformen

Die Expression der bekannten *Sa4CL*-Isoformen sollte *in vitro* und *in vivo* anhand der Konzentration von mRNA-Transkripten analysiert werden. Für diese Expressionsanalysen wurden genspezifische Primer für jede Isoform synthetisiert [IV.2.1]. Diese Primerpaare flankierten einen Bereich von jeweils 1 kb. Die Selektivität der Primerpaare für die jeweilige cDNA wurde mittels PCR bewiesen. Dabei dienten Plasmide mit Insertionen der cDNA-Fragmente als Matrize. Mit Hilfe der genspezifischen Primer wurden semiquantitative RT-PCR Versuche durchgeführt.

2.14.1 Expression in Zellkulturen von *S. aucuparia*

Für die Untersuchung der *in vitro*-Kulturen wurde zunächst gesamt-RNA aus elizitierten und unbehandelten Zellkulturen von *S. aucuparia* gewonnen. Dabei musste auf eine komplette Verdunklung der Zellkulturen während der gesamten Wachstumsphase geachtet werden, da die Expression von Enzymen der Flavonoid-Biosynthese durch Lichtimpulse induziert wird (Kuhn et al., 1984). Als Elizitoren wurden Methyljasmonat, Hefeextrakt, *Venturia inaequalis*-Extrakt und Chitosan eingesetzt. Eine mit Wasser behandelte Zellkultur diente als Kontrolle. Die isolierte gesamt-RNA wurde mit Hilfe der strangaufwärts gerichteten Primer in cDNA revers transkribiert. Daraufhin folgte eine PCR mit 30 Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 50 °C. Eine deutliche Steigerung der Expression der Sa4CL-Isoformen im Vergleich zur Kontrolle konnte nicht festgestellt werden [Abbildung 32a]. Als Indikator für die Biosynthese der Biphenyle wurden Primer für die Biphenyl-Synthase (BIS) in einem zweiten Versuch nach Elizitierung mit Chitosan eingesetzt [Abbildung 32b]. Nur für die BIS ist eine massive Induktion zu beobachten.

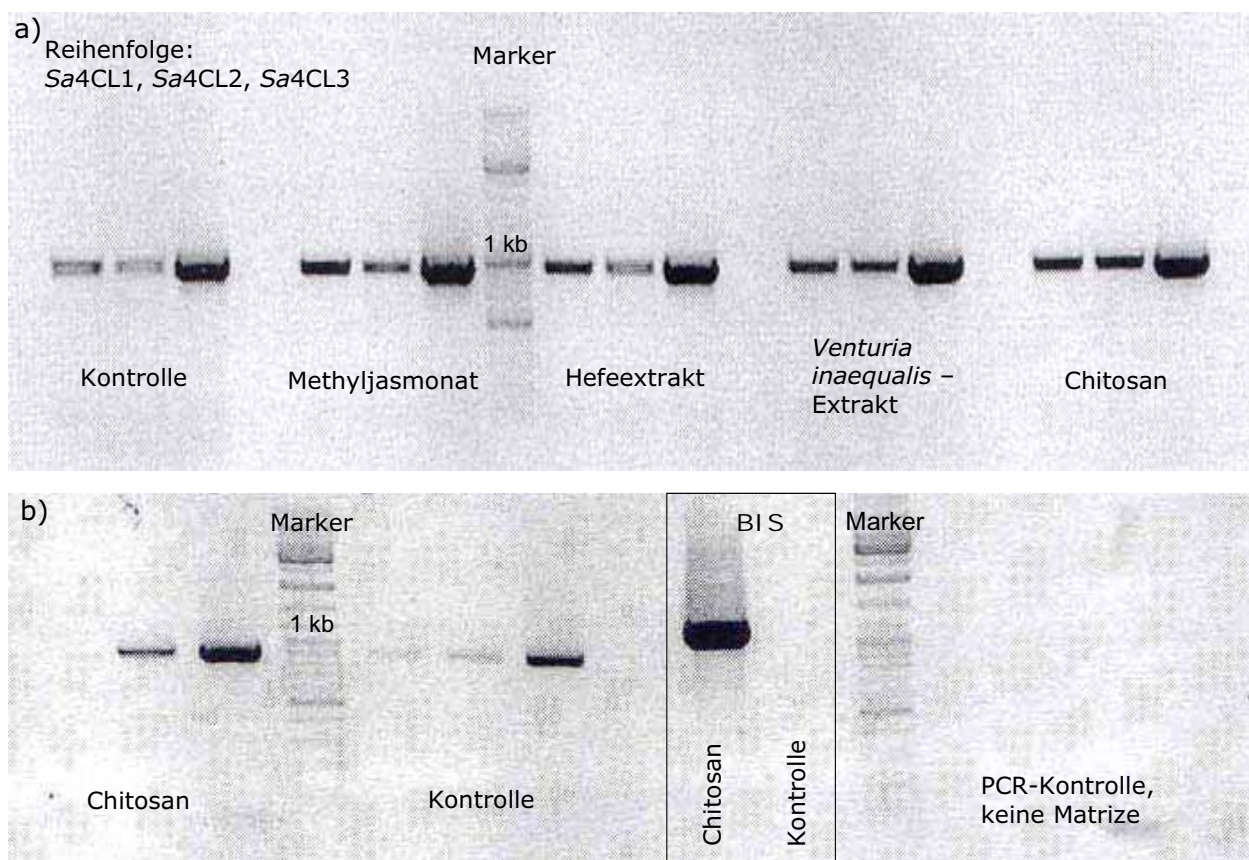


Abbildung 32: Expressionsanalyse mittels RT-PCR von Sa4CL-Isoformen und BIS in Elizitor-behandelten Zellkulturen von *S. aucuparia*

2.14.2 Expression in intakten Pflanzen von *S. aucuparia*

Um die Expression der verschiedenen Isoformen auch in der Pflanze selbst zu beurteilen, wurden verschiedene Pflanzenteile im Frühjahr 2006 gewonnen [IV.1.2]. Aus diesem Material wurden analog II.2.14.1 Untersuchungen zur Expression vorgenommen.

Es konnte eine Expression von *Sa4CL3* in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme des Blattes gefunden werden [Abbildung 33]. *Sa4CL2* war in Präparationen aus der Blüte und der Frucht nachweisbar. *cDNA*-Transkripte von *Sa4CL1* konnten in keinem der untersuchten Organe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils nur einen Entwicklungszeitpunkt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Isoformen in einem anderen Stadium des jeweiligen Gewebes exprimiert werden.

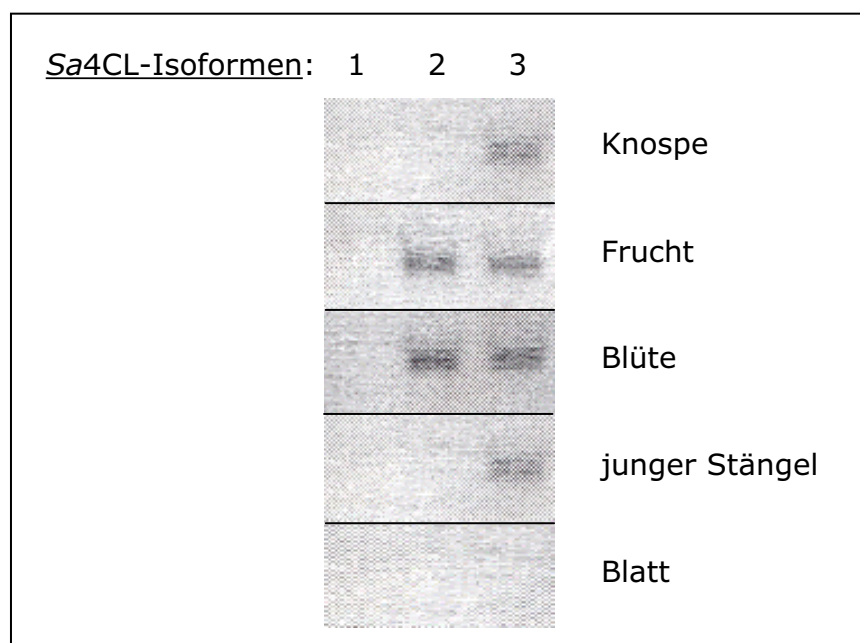


Abbildung 33: Expressionsanalyse mittels RT-PCR von *Sa4CL*-Isoformen in intakten Pflanzenorganen

3 Klonierung von CoA-Ligasen aus *Arabidopsis thaliana*

3.1 Allgemeines

Da aus Zellkulturen von *S. aucuparia* keine cDNA-Fragmente für neue CoA-Ligasen gewonnen werden konnten, wurden weitere Untersuchungen mit dem Modellorganismus *A. thaliana* durchgeführt. Aus dem aufgeklärten Genom der Pflanze konnten bislang 63 Gene für „acyl-activating enzymes“ (AAEs) identifiziert werden. Diese wurden phylogenetisch in 7 Tribus eingeteilt, wovon z.B. die Tribus I die CoA-Ligasen der langkettigen Fettsäuren (LACs) beschreibt und die Tribus IV die 4CLs (Shockey et al., 2003). Die 14 Enzyme der Tribus VI stellen bisher eine funktionell unaufgeklärte, pflanzenspezifische Gruppe dar. Die größte Übereinstimmung weist diese Gruppe gegenüber den LACs und 4CLs auf. Für zwei Enzyme (At3g16910 und At1g66120) wurde *in vitro* eine Aktivität mit kurz- und mittelkettigen Substraten gefunden (Shockey et al., 2003). Für die übrigen 12 Enzyme konnte eine Substratspezifität bisher nicht bestimmt werden. Aufgrund der hohen Identität der Tribus VI zu 4CLs wurde von den Autoren auch eine Aktivierung von aromatischen Substraten vermutet.

In dieser Arbeit wurden aus diesem Grund Vertreter dieser Gruppe auf ihre Aktivität mit solchen Substraten hin untersucht. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf einer möglichen Aktivierung der Benzoesäure. Das resultierende Benzoyl-CoA ist auch Teil der Biosynthese von Glucosinolaten in *A. thaliana*. So weist das Glucosinolatprofil der Samen etwa 20% an benzoilierten Verbindungen auf. Diese sind 3-Benzoyloxypropyl- und 4-Benzoyloxybutylglucosinolat. In geringen Mengen sind sie auch in älteren Blättern zu finden (Brown et al., 2003).

3.2 Selektion von AAEs der Tribus VI

Zu Beginn der Arbeiten war keine Benzoat:CoA-Ligase (BZL) aus Pflanzen identifiziert. Es lagen jedoch Aminosäuresequenzen für bakterielle BZLs vor. Es wurden BZLs aus *Azoarcus evansii*, *Magnetospirillum* sp. TS-6, *Rhodopseudomonas palustris*, *Thauera aromatica* und *Verminephrobacter eiseniae* auf Aminosäureebene verglichen. Daraus konnten bei einer Gesamtidentität von 50-63% hoch konservierte Motive identifiziert werden. Neben den bekannten Motiven Box1 und Box2 fiel ein weiterer hoch konservierter Bereich C-terminal zu Box2 auf. Dieser war

durch die Sequenz TATGKIQR gekennzeichnet. Von den Proteinen der Tribus VI wiesen At1g77240, At3g16910, At1g75960 und At1g21540 eine hohe Übereinstimmung in diesem Motiv auf. Die Aktivität von At3g16910 war bereits bekannt (Shockey et al., 2003). At1g75960 und At1g21540 wurden als potenzielle Kandidaten für BZLs weiter analysiert.

3.3 Klonierung, heterologe Expression und Test auf enzymatische Aktivität

Für die Klonierung der ORFs von At1g75960 und At1g21540 wurde analog dem Arbeitsablauf für Sa4CL2 verfahren [II.2.8]. Zunächst wurden Expressionsprimer mit Restriktionsschnittstellen für die bekannten Sequenzen synthetisiert. Für die Amplifikation der ORFs erfolgte die PCR mittels *Pfu*-Polymerase aus drei unterschiedlichen cDNA-Pools. Diese repräsentierten Samen-, Blatt- und Schotengewebe von *A. thaliana*. Die Amplifikation war nur aus cDNA von Blättern erfolgreich. Es folgten Klonierung in den pRSET B-Vektor und heterologe Expression im bakteriellen System [II.2.9].

Nach heterologer Expression der rekombinanten Enzyme konnten nur geringe Mengen des gesuchten Proteins im Zelllysat per SDS-PAGE detektiert werden. Ein Großteil des Proteins befand sich als unlöslicher Bestandteil im Pellet. Dennoch wurden die Proteinrohextrakte für Tests auf enzymatische Aktivität herangezogen. Dabei wurden die aromatischen Verbindungen analog II.2.10 als mögliche Substrate eingesetzt. Es konnte mit keinem der verwendeten Substrate (Benzoessäure, *p*-Cumarsäure, Zimtsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure) eine Aktivität nachgewiesen werden.

3.4 Sequenzvergleich mit At1g65880

Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde ein erstes pflanzliches Enzym mit Benzoat:CoA-Ligase-Aktivität identifiziert und veröffentlicht (Kliebenstein et al., 2007). Das beschriebene Enzym At1g65880 gruppiert sich wie At1g75960 und At1g21540 in die Tribus VI. Allerdings ist das in dieser Arbeit untersuchte Motiv TATGKIQR nur wenig konserviert. Die Identität des Proteins beträgt darüber hinaus auf Aminosäurenebene nur 44% zu At1g75960 und At1g21540. Somit ist das in bakteriellen BZLs hoch konservierte Motiv nicht entscheidend für die Funktion pflanzlicher Benzoat:CoA-Ligasen.

At1g65880 weist auf Aminosäurenebene lediglich 15-18% Identität gegenüber den genannten bakteriellen BZLs auf. Auch gegenüber 4CLs dikotyler Pflanzen zeigt sich nur eine geringe Übereinstimmung von 11-20%.

4 Synthese von Aucuparin

4.1 Allgemeines

4-Hydroxy-3,5-dimethoxybiphenyl (Aucuparin) ist das mengenmäßig bedeutendste Biphenyl im Phytoalexinspektrum von *S. aucuparia* (Liu et al., 2004). Die chemische Synthese der Verbindung wurde erstmals von Nilsson und Norin (1963) beschrieben. Dabei konnte ausgehend von Phenylcyclohexandionderivaten neben Aucuparin auch das 2'-Methoxyaucuparin gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit sollte ein alternativer Syntheseweg erarbeitet werden, der ausgehend von einer Suzuki-Kupplung nicht nur zu Aucuparin führt, sondern auch Zugang zu Verbindungen mit unterschiedlichem Methylierungsgrad in den Positionen 3, 4 und 5 gewährt. Diese Verbindungen sind bei der biochemischen Untersuchung der letzten Schritte der Aucuparin-Biosynthese von Wert. Hierbei tritt zunächst das 3,5-Dihydroxybiphenyl aus der durch die BIS katalysierten Reaktion hervor. Die weitere Oxidation der Position 4 bzw. die Methylierungen der Positionen 3 und 5 sind bislang nicht aufgeklärt.

4.2 3,4,5-Trimethoxybiphenyl (Stufe 1)

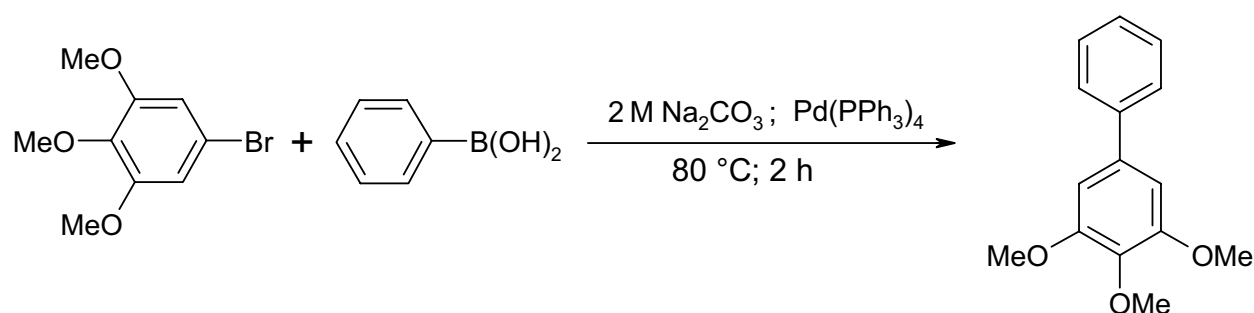


Abbildung 34: Darstellung von 3,4,5-Trimethoxybiphenyl

Das Produkt wurde über Kieselgel gereinigt [V.4.1] und mittels GC-MS und ¹H- sowie ¹³C-NMR charakterisiert. Die Ausbeute betrug 92%.

Das Massenspektrum zeigte als Basispeak das Moleküllion [M]⁺ (*m/z* 244) und die Abspaltung einer Methylgruppe [M-15]⁺ (*m/z* 229) [Abbildung 35].

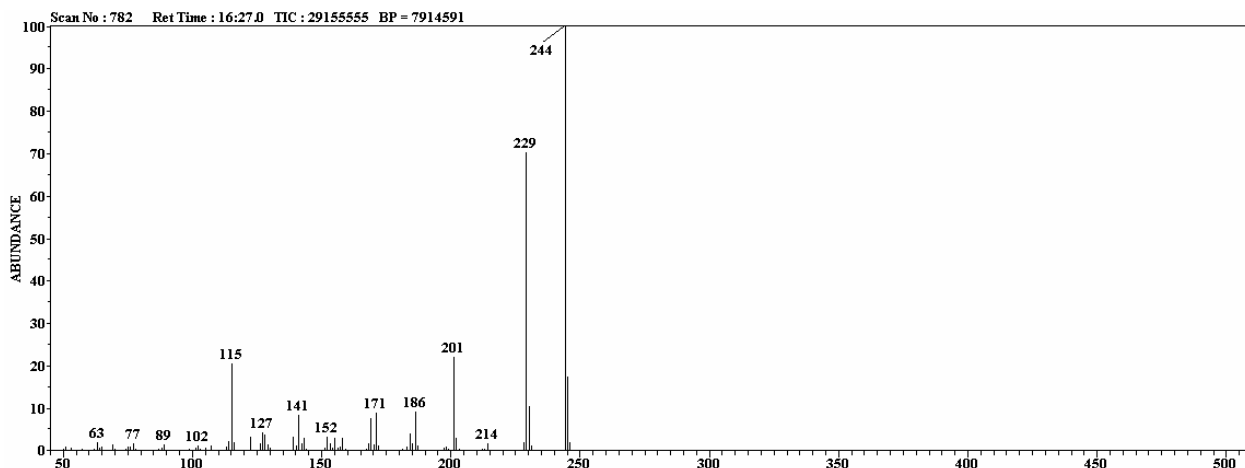


Abbildung 35: Massenspektrum von 3,4,5-Trimethoxybiphenyl

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren die Signale der fünf Protonen des unsubstituierten Phenylrings im Tieffeld zwischen 7.3 und 7.6 ppm als Multipletts abgebildet [Abbildung 36]. Die beiden aromatischen Protonen des substituierten Phenylrings traten als Singulett bei 6.8 ppm auf. Die Protonen der Methylgruppen waren als zwei Singulett bei 3.90 und 3.92 ppm mit Integrationen für 3 bzw. 6 Protonen zu erkennen.

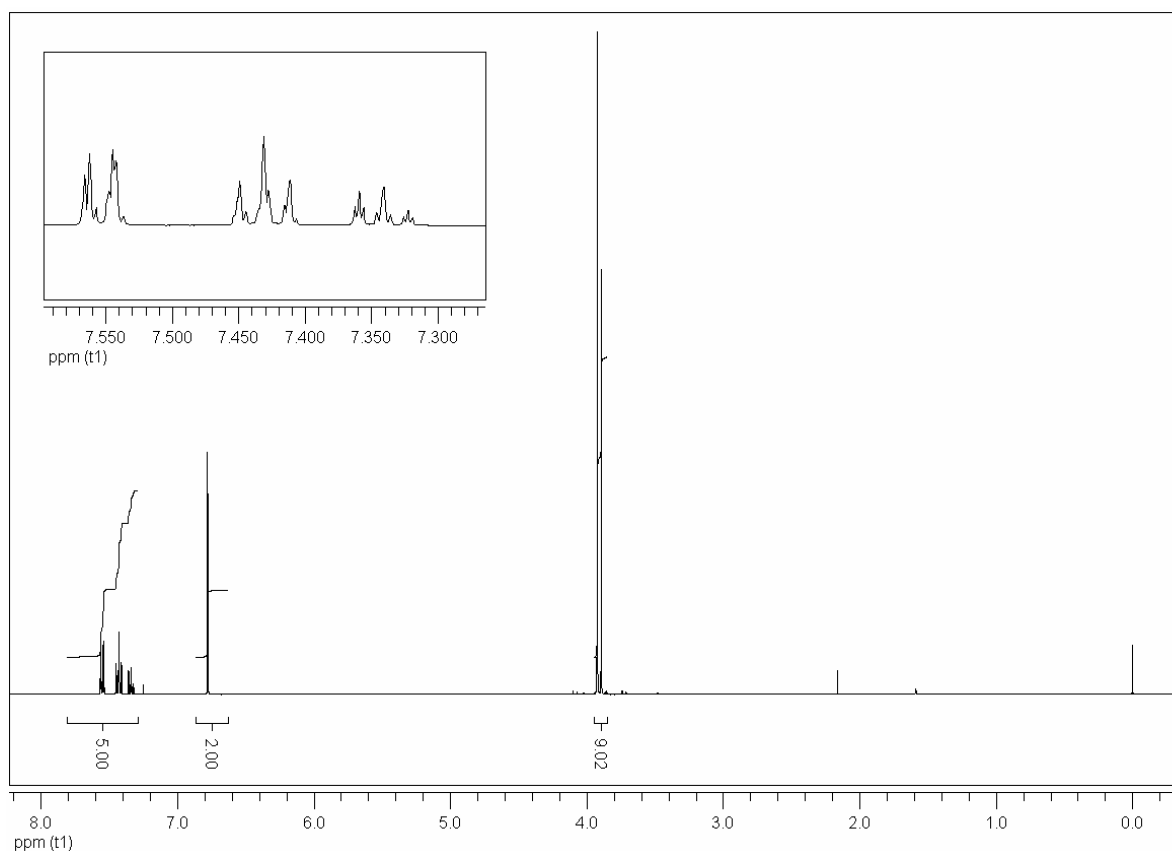
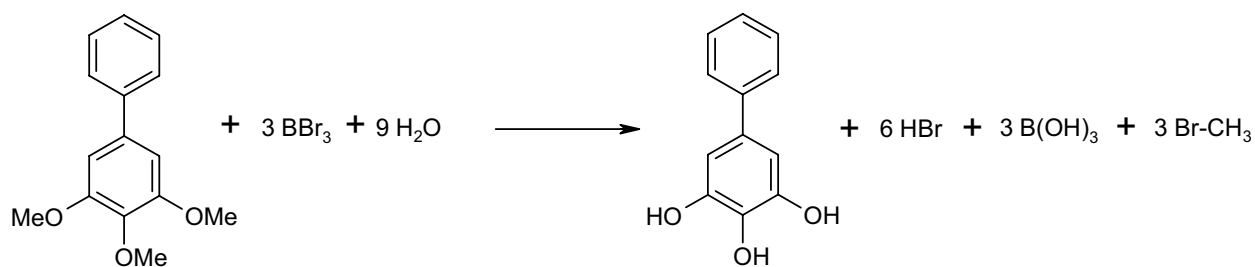


Abbildung 36: $^1\text{H-NMR}$ von 3,4,5-Trimethoxybiphenyl

4.3 3,4,5-Trihydroxybiphenyl (Stufe 2)

Abbildung 37: Schutzgruppenabspaltung mittels BBr₃

Das aus der in Abbildung 37 dargestellten Reaktion hervorgehende Produkt wurde ebenfalls über Kieselgel gereinigt [V.4.2] und mittels GC-MS und ¹H- sowie ¹³C-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Ausbeute betrug 41%.

Nach Silylierung mit MSTFA konnte im Massenspektrum der Basispeak für [M]⁺ (*m/z* 418) gefunden werden. Das entsprach der molaren Masse des dreifach silylierten 3,4,5-Trihydroxybiphenyls. Durch Abspaltung einer Methylgruppe trat auch [M-15]⁺ (*m/z* 403) auf [Abbildung 38].

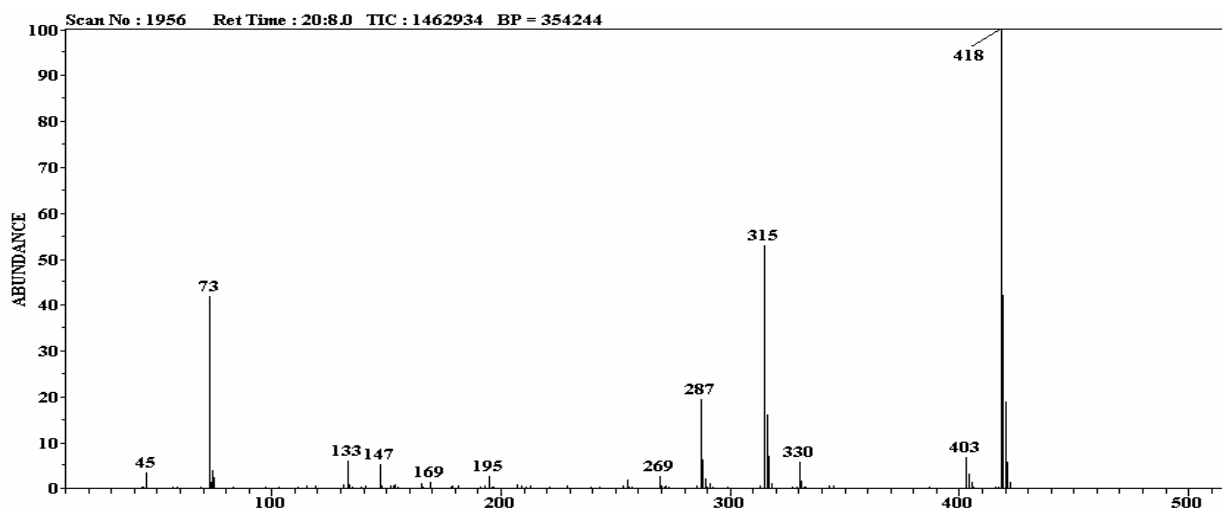


Abbildung 38: Massenspektrum von 3-fach silyliertem 3,4,5-Trihydroxybiphenyl

4.4 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybiphenyl (Aucuparin)

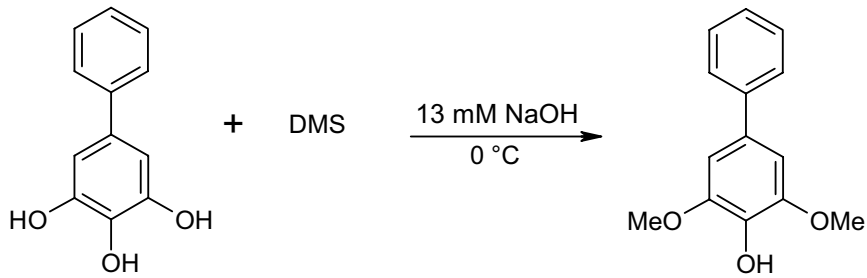


Abbildung 39: Methylierung von 3,4,5-Trihydroxybiphenyl

Bei der Methylierung von 3,4,5-Trihydroxybiphenyl entstanden die isomeren Mono- und Dimethoxyverbindungen genauso wie das Trimethoxybiphenyl. Das Aucuparin wurde durch zweifache Chromatographie an Kieselgel in einer Ausbeute von 0,4% und einer Reinheit von > 95% gewonnen [V.4.3].

Das Massenspektrum der Verbindung wies den Basispeak $[M]^+$ (m/z 230) auf. Daneben konnte wiederum die Abspaltung einer Methylgruppe $[M-15]^+$ (m/z 215) beobachtet werden [Abbildung 40].

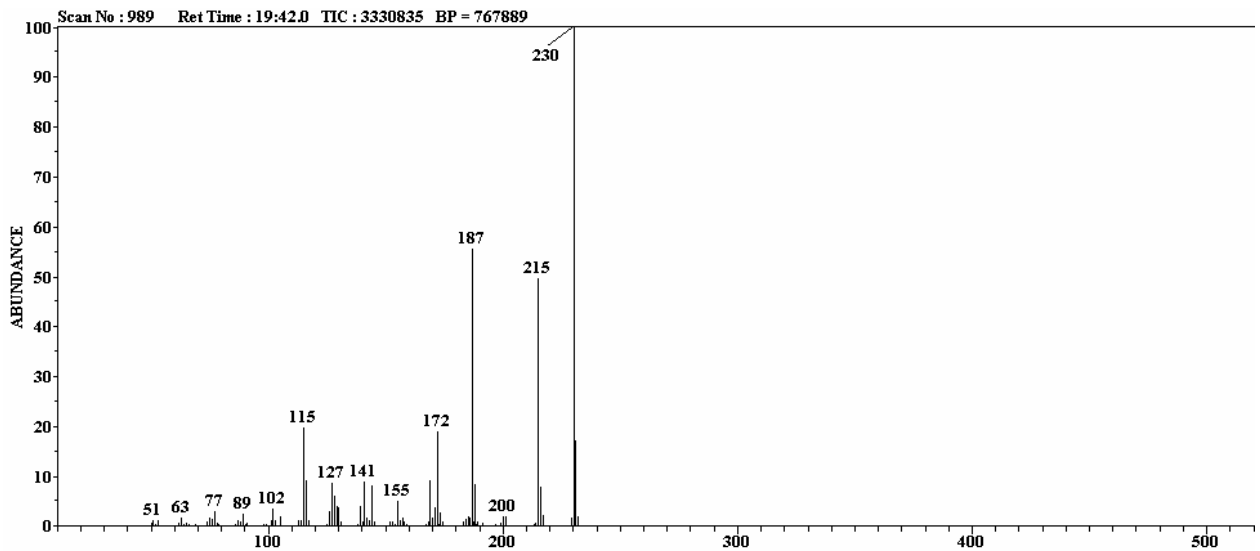


Abbildung 40: Massenspektrum von Aucuparin

Das ^1H -NMR-Spektrum wies die typischen Tieffeldverschiebungen für die aromatischen Protonen auf. Die Wasserstoffatome der Methoxygruppen integrierten für 6 Protonen als Singulett bei 3.9 ppm. Das Proton der Hydroxyfunktion war im tiefen Feld bei 8.5 ppm als breites Singulett abgebildet [Abbildung 41].

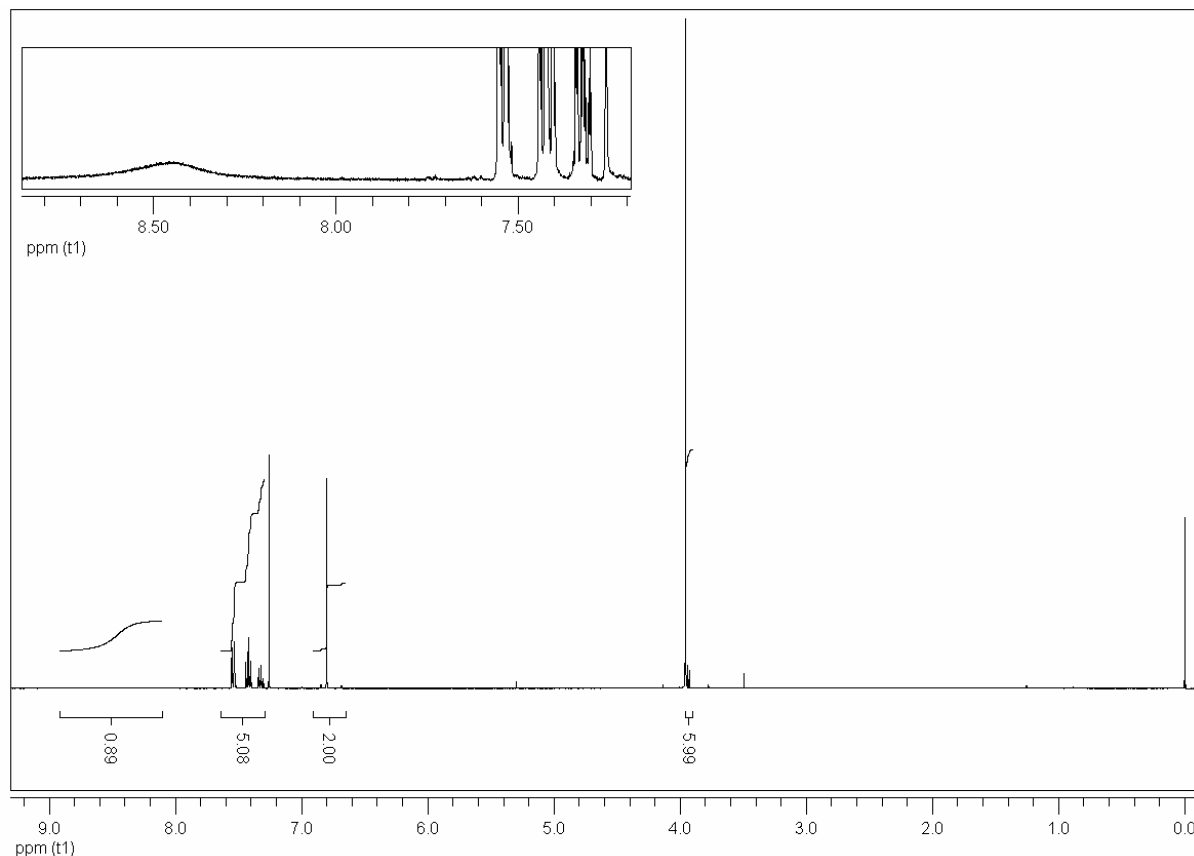


Abbildung 41: ^1H -NMR-Spektrum von Aucuparin (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybiphenyl)

4.5 Nebenprodukte der Synthese

Durch Methylierung von 3,4,5-Trihydroxybiphenyl mit Dimethylsulfat waren alle denkbaren Methylierungsmuster an den Hydroxyfunktionen zugänglich. Abhängig von der Reaktionsdauer und der Konzentration der Natronlauge ließ sich das Fortschreiten der Methylierungen beeinflussen. Dabei traten zunächst die monomethylierten Verbindungen auf. Hier war einerseits eine Reaktion in Position 4 zu erwarten, da die negative Ladung der deprotonierten Hydroxyfunktion über den Phenylring in *p*-Stellung durch Mesomerie stabilisiert werden konnte [Abbildung 42]. Andererseits lag ein symmetrisches Molekül vor, welches sowohl in Position 3 als auch in Position 5 eine Hydroxyfunktion trug. Die Hydroxyfunktionen in *m*-Stellung kamen also doppelt so oft vor und standen so häufiger für eine Methylierung zur

Verfügung. Beide Produkte waren nicht stabil und unterlagen weiteren Methylierungen. Von den dimethylierten Verbindungen war eine Bevorzugung des 3-Hydroxy-4,5-dimethoxybiphenyls zu beobachten. Die erhöhte Azidität der Position 4 durch Mesomerie-Stabilisierung der negativen Ladung konnte diesen Effekt erklären. Neben den mono- und dimethylierten Verbindungen trat nach längerer Reaktionszeit auch vermehrt das 3,4,5-Trimethoxybiphenyl auf. Abbildung 43 stellt einen Ausschnitt des „total ion chromatogram“ (TIC) aus der GC-MS-Analyse eines Reaktionsansatzes nach 0,5 h dar.

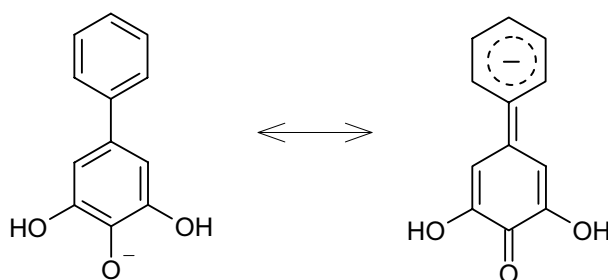


Abbildung 42: Mesomerie-Stabilisierung der deprotonierten Hydroxyfunktion in *p*-Stellung

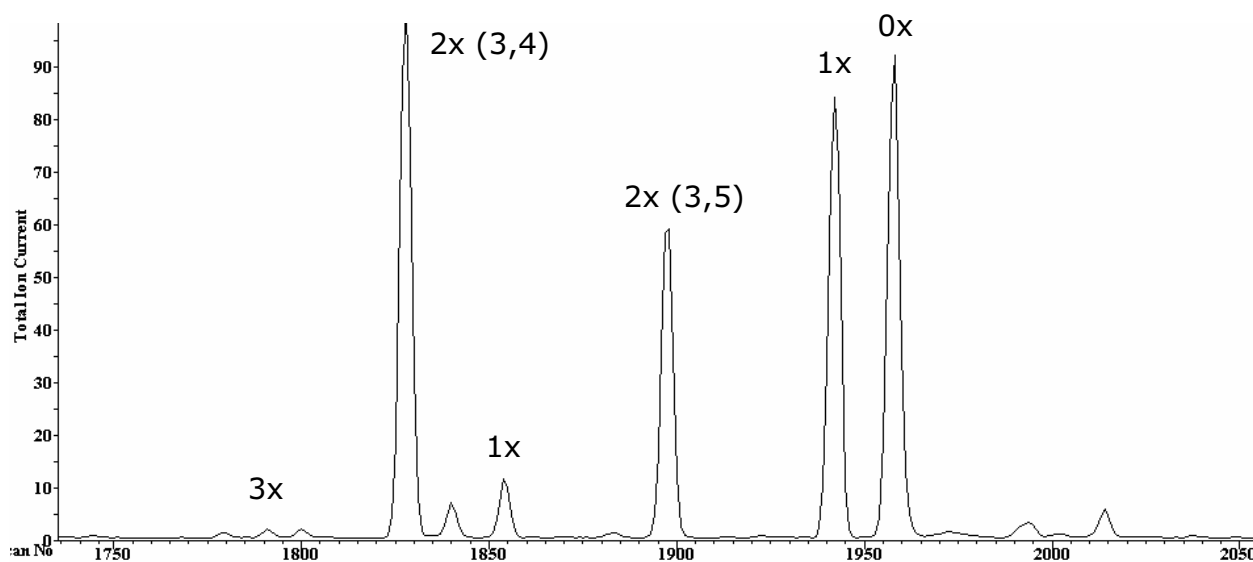


Abbildung 43: TIC eines Methylierungsansatzes nach 0,5 h (x = Anzahl der Methoxyfunktionen), TMS-Derivate

III. Diskussion

1 Benzoessäuren

Benzoessäuren sind in Pflanzen biosynthetisch über zwei voneinander unabhängige Wege zugänglich. Für die Ableitung von Benzoessäuren aus Zimtsäure, dem Produkt der PAL-katalysierten Reaktion, über eine Verkürzung der Seitenkette um eine C₂-Einheit gibt es einige Beispiele. Der Reaktionsmechanismus für diesen Vorgang ist jedoch uneinheitlich. Ein Reaktionsablauf, der sich an die β -Oxidation der Fettsäuren anlehnt, wurde erstmals von Zenk (1965) postuliert. Er konnte zeigen, dass bei der Biosynthese des Vanillins ausgehend von Ferulasäure zwar Vanilloyl-CoA gebildet wurde, die freie Säure aber kein Intermediat der Reaktion war. Aus Untersuchungen mit isotopenmarkierter 3-Hydroxy-3-phenylpropansäure wurde für *Nicotiana attenuata* und *Cucumis sativus* ebenfalls ein β -oxidativer Verlauf angenommen (Jarvis et al., 2000). Auch für *Nicotiana tabacum* konnte aus Versuchen mit markiertem Phenylalanin auf diesen Weg geschlossen werden (Ribnicky et al., 1998). Daneben haben Löscher und Heide (1994) mit Hilfe von radioaktiv markierten *p*-Cumarsäurederivaten gezeigt, dass die Biosynthese von *p*-Hydroxybenzoessäure in Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* über einen β -oxidativen Mechanismus ausgehend von *p*-Cumaroyl-CoA verläuft. Alle genannten Autoren konnten in ihren Versuchen keine Aldehydintermediate nachweisen, welche typisch für einen nicht- β -oxidativen Biosyntheseweg wären. Eine Identifizierung von Enzymen, die an der β -oxidativen Degradation von C₆-C₃-Vorstufen beteiligt sind, ist überdies nicht beschrieben. Lediglich der β -oxidative Reaktionsmechanismus konnte durch Aufklärung der identischen Konfigurationen der Zwischenstufe (3*R*)-3-Hydroxy-3-phenylpropionyl-CoA und Zwischenstufen der β -Oxidation der Fettsäuren erhärtet werden (Hertweck et al., 2001).

Der nicht- β -oxidative Weg ist durch das Auftreten von Benzaldehyd als Zwischenprodukt gekennzeichnet. Unter Katalyse eines bifunktionellen Enzyms mit Hydratase/Lyase-Aktivität könnte durch Retro-Aldolreaktion der Aldehyd aus dem entsprechenden Zimtsäurederivat freigesetzt werden. Die Biosynthese des Vanillins ist bei Bakterien über ein vergleichbares Enzym (Feruloyl:CoA-Hydratase/Lyase)

beschrieben (Gasson et al., 1998; Achterholt et al., 2000). Für Pflanzen ist ein solches Enzym bisher nicht genetisch identifiziert. Dennoch wurde Benzaldehyd in früheren Untersuchungen als Intermediat der nicht- β -oxidativen Reaktion in Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* gefunden (Yazaki et al., 1990). Nach Zufuhr von radioaktiv markiertem Phenylalanin in Zellkulturen von *Daucus carota* konnte er ebenfalls detektiert werden (Schnitzler et al., 1992). Weitere Untersuchungen von Podstolski et al. (2002) an Zellkulturen von *Vanilla planifolia* und Sircar und Mitra (2007) an zellfreien Extrakten aus Wurzelhaarkulturen von *D. carota* konnten die enzymatische Reaktion von *p*-Cumarsäure zu *p*-Hydroxybenzaldehyd belegen. Die beschriebenen Reaktionen waren unabhängig von Cofaktoren. Für *D. carota* schien die Reaktion regulatorisch mit anderen Enzymen des Biosyntheseweges eng verbunden zu sein. So fanden sich nach Elizitierung mit Methyljasmonat neben der erhöhten Aktivität dieser *p*-Hydroxybenzaldehyd-Synthase auch Aktivitätszunahmen der PAL und der Hydroxybenzaldehyd-Dehydrogenase (HBD). Damit wurde eine gleichzeitige Stimulation von drei Enzymen gezeigt, die an der Biosynthese von *p*-Hydroxybenzoesäure beteiligt sind. Die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) wurde in diese Untersuchungen nicht mit einbezogen (Sircar und Mitra, 2007).

Die Komplexität der möglichen Biosynthesewege wurde durch den Befund von Abd El-Mawla und Beerhues (2002) abermals erweitert. In Zellkulturen von *Hypericum androsaemum* kam es erst nach Aktivierung der Zimtsäure zu Cinnamoyl-CoA zur anschließenden Verkürzung der Seitenkette nach dem nicht- β -oxidativen Mechanismus. Auch hier wurde eine Stimulation des Biosyntheseweges durch Zugabe von Methyljasmonat erreicht. Diese Stimulation war durch gleichzeitige Aktivitätserhöhungen von PAL, Cinnamat:CoA-Ligase, Cinnamoyl:CoA-Hydratase/Lyase und Benzaldehyd-Dehydrogenase charakterisiert. Darüber hinaus sind die beschriebenen Biosynthesewege jeweils nicht exklusiv für die Bildung von Benzoesäurederivaten verantwortlich. Boatright et al. (2004) zeigten für Kronblätter von *Petunia hybrida*, dass bei Versuchen mit isotope markiertem Phenylalanin Intermediate beider Wege gefunden werden konnten, wobei 66% der Biosynthese über den nicht- β -oxidativen Weg verliefen.

Pflanzen bedienen sich aber nicht nur der genannten Möglichkeiten zur Biosynthese von Benzoesäuren. Auch Zwischenstufen des Shikimatweges können bereits als direkte Vorläufer für die Biosynthese Verwendung finden. Bei der Betrachtung der Biosynthese der Xanthone in Zellkulturen von *Hypericum androsaemum* und

Centaurium erythraea wurde durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen herausgefunden, dass Benzoesäure nur in Zellkulturen von *H. androsaemum* über Zimtsäure bereitgestellt wird. Markierte Zimtsäure wurde in Zellkulturen von *C. erythraea* nicht für die Biosynthese der Xanthone rekrutiert. Hier konnte aber ein Einbau von markierter 3-Hydroxybenzoesäure beobachtet werden (Abd El-Mawla et al., 2001).

Einen möglichen Verzweigungspunkt im Shikimatweg stellt das Chorismat dar. Dieses kann durch die Isochorismat-Synthase (ICS) zu Isochorismat umgesetzt werden. Durch Abspaltung von Pyruvat könnte daraus Salicylsäure (SA) oder 2,3-Dihydroxybenzoesäure (2,3-DHBA) hervorgehen. Bei *A. thaliana* ICS1-Mutanten wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der SA-Biosynthese und der Aktivität der ICS1 gefunden (Wildermuth et al., 2001). Muljono et al. (2002) haben Zellkulturen von *Catharanthus roseus* im Hinblick auf die 2,3-DHBA-Biosynthese untersucht. Die durchgeführten Einbauversuche mit isopenmarkierter Glucose zeigten eine größere Übereinstimmung der Markierungen für einen Biosyntheseweg über Isochorismat als über Phenylalanin.

Die Biosynthese der 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (Gallussäure) wurde in Blättern von *Rhus typhina* mit Hilfe von ^{13}C -markierter Glucose erforscht (Werner et al., 1997). In dieser retrobiosynthetischen NMR-Studie wurde die Bildung der Gallussäure aus Shikimisäure postuliert. Dabei wurde als Reaktionsablauf eine direkte Dehydrierung der Shikimisäure favorisiert. Eine Dehydratation und anschließende Oxidation des Intermediats wurde aber nicht vollständig ausgeschlossen.

Ein weiterer Ansatz über retrobiosynthetische NMR-Experimente wurde für die Biosynthese von 3-Hydroxybenzoesäure (3-HBS) in Wurzelkulturen von *Swertia chirata* verfolgt (Wang et al., 2003). Auch hier wurde mit ^{13}C -markierter Glucose [1-/ $\text{U-}^{13}\text{C}$] und daneben mit ^{13}C -markierter Shikimisäure gearbeitet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten einen Anteil von 98% eines frühen Shikimatweg-Intermediats vor der Stufe des Phenylpyruvats als Ausgangspunkt der Biosynthese des letztendlich gebildeten 1,3,5,8-Tetrahydroxyxanths. Ausgehend vom Shikimat wurde der in Abbildung 44 gezeigte Reaktionsablauf vorgeschlagen.

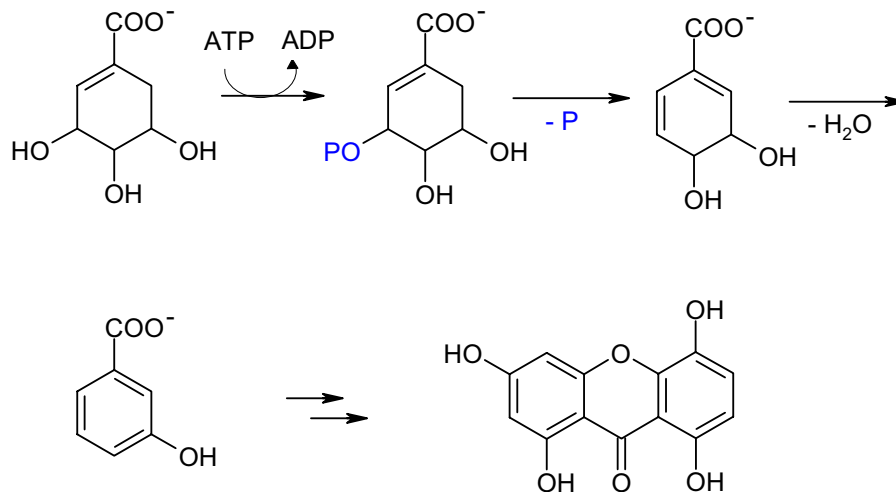


Abbildung 44: Biosyntheseweg vom Shikimat zum 3-Hydroxybenzoat in *S. chirata* (Wang et al., 2003)

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Reaktion in zellfreiem Extrakt aus Zellkulturen von *C. erythraea* unterstützt den postulierten Weg der 3-HBS-Biosynthese. Hier konnte erstmals auf biochemischer Ebene die ATP-abhängige Bildung von 3-HBS aus Shikimisäure gezeigt werden. Die Reaktion benötigte als weiteren Cofaktor Magnesium, war aber unabhängig von Redoxäquivalenten wie NADP/NADPH. Die Reaktion kann also durch die Aktivierung der Hydroxyfunktion in Position 3 mittels ATP, anschließender Abspaltung von Phosphat und folgender Eliminierung von Wasser erklärt werden. Ob die zweite Eliminierung von Wasser ebenfalls über eine ATP-vermittelte Aktivierung der Hydroxyfunktion erfolgt, ist ungeklärt. Die Reaktion selbst stellt die Schnittstelle zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus für die Biosynthese der Xanthone in *C. erythraea* dar. Das Produkt 3-HBS ist das bevorzugte Substrat der 3-Hydroxybenzoat:CoA-Ligase, die bereits von Barillas und Beerhues (1997) gereinigt und charakterisiert wurde. Über die Benzophenon-Synthase (Beerhues, 1996) wird intermediär das Polyketid 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon gebildet. Es kommt dann durch die Xanthon-Synthase, ein membrangebundenes Cytochrom P450-Enzym, regioselektiv zur Bildung des 1,3,5-Trihydroxyxanthon (Peters et al., 1997). Abschließend folgen weitere Oxidationen, Methylierungen und Glykosylierungen, die unterschiedlich substituierte Xanthone hervorbringen.

Zur weiteren Aufklärung dieses bisher in Pflanzen und Mikroorganismen unbekanntes Enzyms ergeben sich keine molekularbiologischen Ansätze. Für eine Homologieklonierung bieten sich kaum bakterielle Sequenzen zur Ableitung von degenerierten Primern an, da formal ähnliche Reaktionen, wie z.B. die der Prephenat-Dehydratase (Dopheide et al., 1972), nicht ATP abhängig sind. Somit muss auch ein anderer Reaktionsmechanismus angenommen werden. Die Reinigung des „Shikimat-Dehydratase“ benannten Enzyms aus Zellkulturen von *C. erythraea* wird daher zur endgültigen Identifizierung angestrebt.

2 *p*-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL)

Die *p*-Cumarat:CoA-Ligase (4CL, EC 6.2.1.12) wird seit Anfang der 1970er Jahre intensiv erforscht. Sie stellt nach der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), die einen Übergang zum Sekundärmetabolismus repräsentiert, und der Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) das letzte Enzym des allgemeinen Phenylpropanwegs dar. Über die Aktivierung von Zimtsäurederivaten als Coenzym A-Ester stellt sie Vorstufen für die Biosynthese von Lignin, Flavonoiden und weiteren Phenylpropanderivaten bereit. Die freien Säuren als Substrate der 4CL liegen bei physiologischem pH-Wert im Cytosol der Pflanzenzelle dissoziiert vor. Die negative Ladung der Carboxylat-Gruppe kann über beide Sauerstoffatome resonanzstabilisiert werden. Die Aktivierungsenergie dieser Gruppe für weitere Reaktionen ist dementsprechend hoch. Acyl:CoA-Synthetasen, wie z.B. 4CL, aktivieren die Carboxylat-Gruppe über eine zweistufige Reaktion. Der erste Teil besteht in der Bindung von ATP und der Abspaltung von Pyrophosphat (PPi). Durch Anlagerung des Zimtsäure-Substrats kommt es zur Bildung eines enzymgebundenen Acyl-AMP-Intermediats. Dieser Reaktionsschritt wird von vielen Enzymen mit unterschiedlichen Funktionen, wie Luciferasen, nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen und Acyl:CoA-Synthetasen geteilt (Ehltung et al., 2001). In einem zweiten Reaktionsschritt wird dann im Falle der Acyl:CoA-Synthetasen der Carbonyl-Kohlenstoff nukleophil über freie Elektronen der Thiofunktion von angelagertem Coenzym A attackiert. Der resultierende Thioester und AMP gehen als Produkte aus der Reaktion hervor (Shockey et al., 2003).

4CL gehört damit zur Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme. Die Enzyme dieser Familie weisen insgesamt eine geringe Identität auf Aminosäureebene auf, besitzen aber gleichsam konservierte Motive, die bei Luciferasen, nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen und Acyl:CoA-Synthetasen vorhanden sind. Diese strukturellen Merkmale sind für die Gruppierung in diese Superfamilie herangezogen worden (Fulda et al., 1994). Abgesehen von der geringen Übereinstimmung der Primärstruktur zeigen Vertreter der einzelnen Subfamilien einen gleichartigen Aufbau der Proteinkonformation. Die Untersuchungen an Luciferase (Conti et al., 1996), nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen wie z.B. der Phenylalanin-aktivierenden Domäne der Gramacidin S-Synthetase (PheA) aus *Bacillus brevis* (Conti et al., 1997) und der 2,3-Dihydroxybenzoat-aktivierenden Domäne aus *Bacillus subtilis* (May et al., 2002), sowie an Acetyl:CoA-Synthetasen aus *Salmonella enterica* (Gulick et al., 2003) und

Hefe (Jogl und Tong, 2004) zeigen einen übereinstimmenden Aufbau aus einer großen N-terminalen und einer kleineren C-terminalen Domäne. Beide Domänen sind über eine Hinge-Region miteinander verbunden. Diese Hinge-Region ist bei der Benzoat:CoA-Ligase aus *Burkholderia xenovorans* an der Bindung des Arylsubstrats beteiligt (Bains und Boulanger, 2007). Die N-terminale Domäne beherbergt hoch konservierte Bereiche, die als A3 und A6 bzw. Box1 und Box2 beschrieben sind (Schneider et al., 2003). Hoch konserviert und für die katalytische Funktion entscheidend ist ein Lysinrest in der C-terminalen Domäne (Lys⁵¹⁷ in PheA). Über zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carboxylfunktion stabilisiert diese Aminosäure vermutlich die Bindung des Substrats (Bains und Boulanger, 2007). Interessanterweise konnten für die verschiedenen Kristallstrukturen unterschiedliche Konformationen der beiden Domänen zueinander gefunden werden, abhängig von kokristallisierten Faktoren wie Coenzym A, AMP oder Substrat. Es wird daher angenommen, dass die Adenylat-bildenden Enzyme während der mehrphasigen Reaktion auch mehrmals einer Konformationsänderung unterliegen, wobei jeweils andere Aminosäuren der C-terminalen Domäne Übergangszustände stabilisieren (Jogl und Tong, 2004). Diese Konformationsänderungen beinhalten eine Rotation der kleineren Domäne um $\sim 140^\circ$ bei der Anlagerung von Coenzym A, woraus die Bildung der CoA-Bindetasche resultiert (Gulick et al., 2003).

Innerhalb der Subfamilie der Acyl:CoA-Synthetasen bilden 4CLs eine eigenständige pflanzenspezifische Gruppe monophyletischen Ursprungs (Cukovic et al., 2001). Für 4CLs sind vor allem die konservierten Motive der Box1 und der Box2 Gegenstand funktioneller Untersuchungen gewesen (Stuible et al., 2000). Die Bedeutung des in 4CLs nahezu komplett konservierten Motivs der Box2 (GEICIRG) ist bislang unklar. Durch Einführung von Mutationen in dieses Motiv von At4CL2 konnte lediglich eine Reduktion der spezifischen Aktivität auf 21% bzw. 45% gezeigt werden (Glu401Gln, Cys403Ala). Die Mutation des bereits erwähnten Lysins (Lys540Asn) in der C-terminalen Domäne führte hingegen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Eine direkte Beteiligung des Box2 Motivs am katalytischen Mechanismus ist daher unwahrscheinlich. Box1 wurde lange als putative AMP-Bindungsdomäne diskutiert. Dieser Ansatz wurde jedoch durch die Aufklärung der Konformation der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-Synthetase 1 (PheA) im Komplex mit AMP nicht bestätigt. Die Kristallstruktur zeigt für diesen Bereich eine flexible Schleife zwischen zwei β -Faltblättern. Möglicherweise ist

diese Struktur an der Ausschleusung des abgespaltenen Pyrophosphats beteiligt (Conti et al., 1997).

Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Substratspezifität von 4CLs genauer zu erklären. Von 4CLs akzeptierte Substrate sind *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und Zimtsäure [Abbildung 45]. 4CLs kommen in höheren Pflanzen meist als Genfamilien mit zwei oder drei Mitgliedern vor. In *Salvia miltiorrhiza* (Zhao, 2006), *Solanum tuberosum* (Becker-Andre et al., 1991), *Petroselinum crispum* (Lozoya et al., 1988) und *Nicotiana tabacum* (Lee und Douglas, 1996) wurden jeweils zwei Isoformen mit ähnlichen Substratspezifitäten gefunden. Andere Untersuchungen konnten Mitglieder mit distinkten Substratspezifitäten aufzeigen, die eine Spezialisierung der Isoformen nahelegen. Das Vorkommen solcher Isoformen wurde beispielsweise für *Populus tremuloides* (Hu et al., 1998), *Arabidopsis thaliana* (Ehltung et al., 1999), *Glycine max* (Lindermayr et al., 2002) und *Rubus idaeus* (Kumar und Ellis, 2003) gezeigt. Isoformen, die an der Biosynthese des Lignins beteiligt sein sollen, weisen dabei eine höhere Aktivität mit Kaffeesäure und/oder Ferulasäure auf und werden der Klasse I zugerechnet. Isoformen der Klasse II sollen mit der Biosynthese von Flavonoiden und anderen Phenylpropanen assoziiert sein und weisen eine hohe Aktivität gegenüber *p*-Cumarsäure auf.

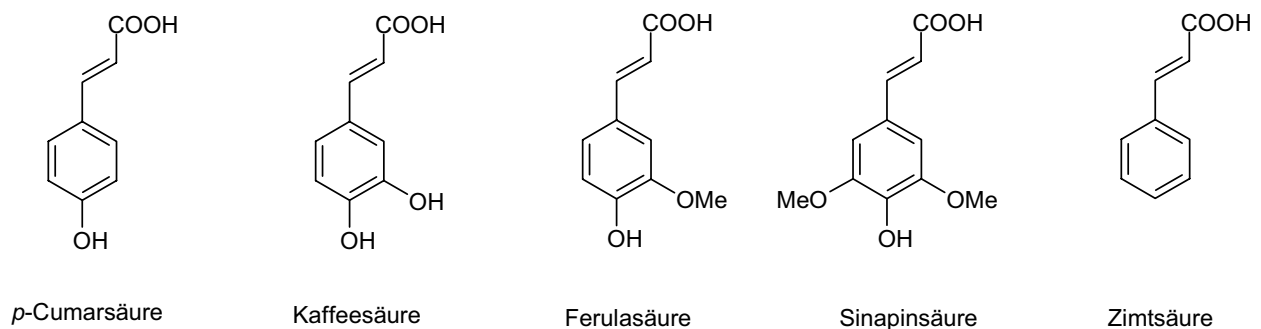


Abbildung 45: Substrate von 4CLs

Sinapinsäure wurde bisher nur von zwei heterolog exprimierten 4CLs als Substrat akzeptiert. Dabei handelt es sich um *Gm*4CL1 aus der Sojabohne (*Glycine max*) (Lindermayr et al., 2002) und *At*4CL4 aus *A. thaliana* (Hamberger und Hahlbrock, 2004). Die physiologische Bedeutung dieser außergewöhnlichen Aktivität ist aber fraglich. Für knockout-Mutanten des entsprechenden Gens von *A. thaliana* wurden im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen in der Zusammensetzung und der Menge des gebildeten Lignins beobachtet (Costa et al., 2005). Allerdings konnten die Enzyme mit

den ungewöhnlichen Substratspezifitäten gut für die Weiterentwicklung eines Modells für die Substratdiskriminierung von 4CLs herangezogen werden. Die Umsetzung von Sinapinsäure wurde bei den übrigen 4CL-Isoformen der Sojabohne durch Deletion eines Valins (Gm4CL2 dVal³⁴⁵; Gm4CL3 dVal³⁶⁷) N-terminal zur Box2 erreicht (Lindermayr et al., 2003). Diese Aminosäure fehlt der *Gm4CL1*. Dieses Modell konnte durch Schneider et al. (2003) für *At4CL2* bestätigt werden. Aus einem Homologiemodell der *At4CL2* auf Basis der Kristallstruktur der Phenylalanin-aktivierenden Domäne der Gramacidin S-Synthetase aus *Bacillus brevis* wurde für die Aktivierung der Sinapinsäure ein Größenausschluss-Mechanismus gefolgert. Demnach kann Sinapinsäure aufgrund der zwei Methoxyfunktionen in den Positionen 3 und 5 nicht in das aktive Zentrum anderer 4CLs eindringen. Erst durch Deletion von *At4CL2* Val³⁵⁵ oder Leu³⁵⁶ wurde eine Vergrößerung der Bindetasche erreicht, so dass auch Sinapinsäure als Substrat akzeptiert wurde. Mit Hilfe des gleichen Modells konnte auch die Aktivierung der Zimtsäure, die ein schlechtes Substrat der meisten 4CLs ist, über eine Erhöhung der Lipophilie von drei Aminosäuren der Bindetasche beschrieben werden. Das Modell wurde experimentell über drei eingeführte Mutationen bestätigt (*At4CL2* N256A, M293P, K320L). Insgesamt heben die Autoren 12 Aminosäuren zwischen den hoch konservierten Motiven Box1 und Box2 hervor, die für die Substratspezifität von 4CLs verantwortlich sein sollen.

Sorbus aucuparia 4CLs weisen eine hohe Identität gegenüber den 4CL-Isoformen aus *Rubus idaeus* auf. Die in dieser Arbeit untersuchte *Sa4CL2* weist die höchste Übereinstimmung (88%) mit *Ri4CL2* auf, die eine außergewöhnlich hohe Aktivität mit Zimtsäure zeigt (Kumar und Ellis, 2003). Diese hohe Aktivität teilt *Sa4CL2* jedoch nicht. Betrachtet man die von Schneider et al. (2003) beschriebenen 12 Aminosäuren, so finden sich keine Unterschiede in den betreffenden Bereichen. In den drei Positionen, die für eine Erhöhung der Lipophilie der Bindetasche verantwortlich sein sollen, herrscht also Übereinstimmung (*Sa4CL2* Asn²⁴⁷, Pro²⁸⁴, Met³¹¹). Von diesen drei Aminosäuren weisen zwar Pro²⁸⁴ und Met³¹¹ eine geringe Polarität auf, die polare Aminosäure Asn²⁴⁷ entspricht aber nicht dem von Schneider et al. (2003) vorgeschlagenen Modell. Die Unterschiede in der relativen Aktivität mit Zimtsäure von *Ri4CL2* (153%) und *Sa4CL2* (51%) lassen sich so nicht erklären. Von Kumar und Ellis (2003) sind über die relative Aktivität hinaus keine weiteren kinetischen Daten für *Ri4CLs* veröffentlicht worden. So ist ein direkter Vergleich dieser Parameter (K_M ,

V_{\max}) nicht möglich. Die versuchte Amplifikation der *Ri4CL2*-cDNA für eine vergleichende Charakterisierung des rekombinanten Genprodukts war im Rahmen dieser Arbeit erfolglos. Der direkte Aktivitäts- und Sequenzvergleich beider Enzyme könnte aber neue Hinweise auf bisher nicht erkannte Strukturmerkmale für die Substratspezifität geben.

Die kinetischen Parameter von *Sa4CL2* weisen auf eine Beteiligung des Enzyms an der Ligninbiosynthese hin [Tabelle III-1]. Im Gegensatz zu *Sa4CL3* (Ramadan, 2006) hat das Enzym niedrige K_M -Werte und hohe katalytische Effizienzen für Kaffeesäure und Ferulasäure. Gegenüber *p*-Cumarsäure aber besitzt es einen erhöhten K_M -Wert und eine geringe katalytische Effizienz. Solche deutlichen Unterschiede sind auch für die K_M -Werte von heterolog exprimierten 4CL-Isoformen aus *A. thaliana* (Ehltting et al., 1999) und *G. max* (Lindermayr et al., 2002) beschrieben.

Tabelle III-1: K_M -Werte [μM] für Substrate verschiedener rekombinanter 4CLs (*At*: *A. thaliana*, *Gm*: *G. max*, *Sa*: *S. aucuparia*)

Substrat			
	At4CL1	At4CL2	At4CL3
p-Cumarsäure	38	252	23
Kaffeesäure	11	20	374
Ferulasäure	199	n.u.	166
Zimtsäure	6320	6630	2070

	Gm4CL1	Gm4CL2	Gm4CL3
p-Cumarsäure	22	42	9
Kaffeesäure	33	13	50
Ferulasäure	8	140	3100
Zimtsäure	4400	1700	1100

		Sa4CL2	Sa4CL3
p-Cumarsäure		3	9
Kaffeesäure		1	13
Ferulasäure		1	50
Zimtsäure		23	33

(n.u.) nicht umgesetzt

Phylogenetische Untersuchungen an bisher klonierten 4CLs aus unterschiedlichen Pflanzen resultieren in der Bildung von drei unabhängigen Clustern. Im Cluster der Klasse I-4CLs finden sich in enger Verwandtschaft die Isoformen 1 und 2 jeweils aus *R. idaeus* und *S. aucuparia*. Aus *S. tuberosum*, *N. tabacum*, *P. balsamifera* und *A. thaliana* gruppieren die artspezifischen Isoformen 1 und 2 eng zusammen. Dies deutet auf ein relativ junges Ereignis der Genduplikation hin, da häufig auch kinetische Parameter und Expressionsmuster der Isoformen sehr ähnlich sind (Allina et al., 1998). Die 4CLs der Klasse II zeigen eine größere Distanz zu den arteigenen Isoformen der Klasse I als zu artfremden Enzymen der gleichen Klasse. Außerdem unterscheiden sich die Isoformen der Klasse II von den Isoformen der Klasse I im Expressionsmuster und in ihren kinetischen Parametern und Substratspezifitäten. Diese Unterschiede wurden für Isoformen von *Salvia miltiorrhiza* (Zhao, 2006), *L. erythrorhizon* (Yazaki et al., 1995), *G. max* (Lindermayr et al., 2002) und *R. idaeus* (Kumar und Ellis, 2003) beschrieben und treffen auch auf Sa4CL2 und Sa4CL3 zu. Ein weiterer Unterschied zeigt sich auch in der Intron/Exon-Struktur einiger Gene. So weisen die Isoformen der Klasse I und II sowohl von *A. thaliana* (Ehlting et al., 1999) als auch von *P. tremuloides* (Hu et al., 1998) unterschiedlich viele Introns auf. Die Aufspaltung der Klassen I und II kann daher auf eine weit frühere Genduplikation zurückgeführt werden, die seither eine stete funktionelle Anpassung der Enzyme erlaubt.

Der Cluster der Klasse III-4CLs weist ausschließlich Enzyme von monokotylen Pflanzen auf. Da für diese Klasse nur wenige Sequenzen aufgeklärt sind und auch kaum Daten über Expressionsmuster vorliegen, hat eine genauere Einteilung bisher nicht stattgefunden (Kumar und Ellis, 2003). Abbildung 46 zeigt eine auf Sequenzidentität basierende phylogenetische Ableitung von 4CLs, die um die Isoformen aus *S. aucuparia* erweitert wurde. Die Isoform 1 ist durch die bislang aufgeklärte Teilsequenz von 354 Aminosäuren repräsentiert (*Sorbus aucuparia* 4CL1 (part.)).

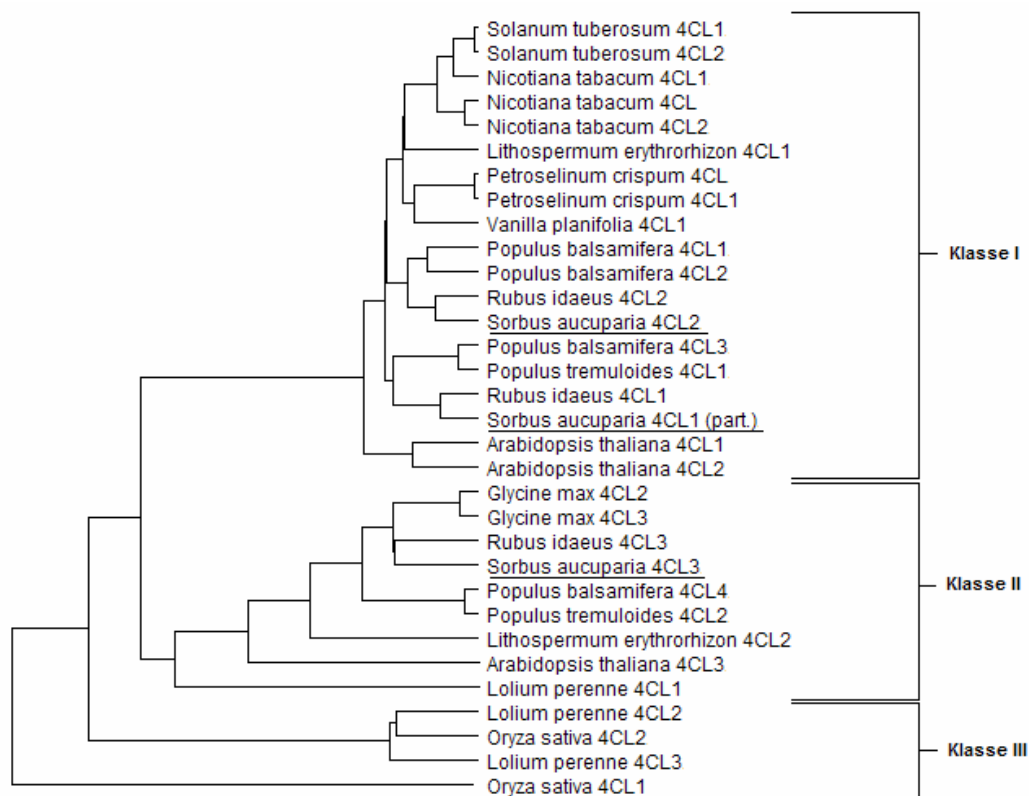


Abbildung 46: Phylogenetische Darstellung von 4CLs einschließlich der *S. aucuparia* Isoformen

Die Einteilung von 4CL-Isoformen spiegelt sich nicht nur in ihren katalytischen Eigenschaften und der Aminosäuresequenz wider, sondern lässt sich auch über eine differenzielle Expression begründen. Eine unterschiedliche Regulation der 4CL-Isoformen aus *P. tremuloides* wurde durch Aufklärung der 5' flankierenden Bereiche beider ORFs gezeigt (Hu et al., 1998). Dabei traten für *Pt4CL1* schon bekannte *cis*-Elemente im Promotorbereich auf, die eine Koregulation mit PAL nahe legten. Im Gegensatz dazu konnten für *Pt4CL2* diese regulatorischen Elemente nicht gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden semiquantitative RT-PCR-Analysen an unterschiedlichen Geweben durchgeführt, um eine differenzielle Expression der *Sa4CL*-Isoformen zu untersuchen. Hierbei zeigte sich eine hohe Übereinstimmung mit den von Kumar und Ellis (2003) für *R. idaeus* veröffentlichten Daten. *Sa4CL3* ist demnach in allen Geweben mit Ausnahme des untersuchten Blattstadiums zu finden. Für *Sa4CL2* finden sich Transkripte in Blüten und Früchten, nicht aber im Blatt. Dieses stimmt mit den Daten von *Ri4CL2* überein, wobei dort jedoch zusätzlich Transkripte im Stängel gefunden wurden. Die beschriebene Expression

der *Ri4CL1* war in den untersuchten Geweben sehr gering, mit einem etwas stärkeren Signal für das Blatt. Für *Sa4CL1* konnten keine Transkripte nachgewiesen werden. Dieser Befund kann durch eine ungenügende Sensitivität der Methode unter den gewählten Versuchsbedingungen begründet sein, weist aber ebenfalls auf eine geringe Expression hin. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass auch die *Sa4CL*-Isoformen differenziell exprimiert werden. Die stärkeren Signale der *Sa4CL3* in Knospe, Blüte und Frucht entsprechen den Geweben mit hohem Flavonoidgehalt. Die Substratspezifität dieser Isoform, die eine hohe Affinität zu *p*-Cumarsäure aufweist, legt ebenfalls eine Beteiligung an der Biosynthese der Flavonoide nahe. Für *Sa4CL2* wäre ein starkes Signal für den Stängel zu erwarten gewesen. Die Substratspezifität dieser Isoform zeigt eine hohe Affinität zu Kaffeesäure und Ferulasäure. Dies unterstützt die strukturell basierte Gruppierung in die Klasse I der 4CLs, die für die Ligninbiosynthese verantwortlich sind. Dass hier nur Transkripte in Blüte und Frucht gefunden wurden, kann in der frühen Wachstumsphase des untersuchten Triebes begründet sein.

Die Untersuchungen auf eine erhöhte Expression nach Elizitierung der Zellkultur von *S. aucuparia* zeigten keine deutliche differenzielle Veränderung zwischen den einzelnen 4CL-Isoformen. Nach Zugabe der Elizitoren war eine vermehrte Expression zu erwarten, da Phenylpropane und auch frühe Produkte der Ligninbiosynthese an der Pathogenabwehr von Pflanzen beteiligt sind (Kombrink und Schmelzer, 2001). Dabei ist häufig eine koordinierte Induktion von Enzymen eines Stoffwechselweges zu beobachten. So kommt es beispielsweise bei der Infektion von Kartoffeln durch *Phytophthora infestans* zur simultanen Stimulation der PAL- und der 4CL-Expression (Fritzemeier et al., 1987).

Tatsächlich wurde auch für Zellkulturen von *S. aucuparia* insgesamt eine leicht erhöhte Expression aller drei 4CL-Isoformen beobachtet. Dass diese geringe Zunahme der Expression im Zusammenhang mit der Biosynthese der Benzoesäure und damit der Biphenyl-Biosynthese steht, ist hingegen unwahrscheinlich, da für die BIS eine massive Expression nach Elizitierung auftrat. Die nur leicht erhöhte Expression der 4CL-Isoformen ist eher mit Mechanismen von „systemic acquired resistance“ (SAR) und „hypersensitiv response“ (HR) zu erklären, wonach eine erhöhte Aktivität von Genen des Primär- und Sekundärstoffwechsels nach Pathogenkontakt zu erwarten ist (Kombrink und Schmelzer, 2001). Dieses Ergebnis widerspricht in Kombination mit den hier gefundenen Substratspezifitäten von

Sa4CL2 und *Sa4CL3* der Vermutung, dass diese Isoformen einen Teil der Biosynthese der Biphenyle in *S. aucuparia* darstellen könnten. Die nur leicht erhöhte Expression nach Elizitierung und die Unfähigkeit der Enzyme, Benzoessäure zu aktivieren, sprechen letztendlich für eine klassische Rekrutierung der *Sa4CLs* für die Biosynthese des Lignin und anderer Phenylpropane. Auch die Primärstruktur der Enzyme sowie die übrigen kinetischen Parameter bestätigen diese Funktion.

Durch Ramadan (2006) und durch diese Arbeit wurden zwei von drei *p*-Cumarat:CoA-Ligasen aus *Sorbus aucuparia* beschrieben. Nach Aufklärung der verbleibenden Isoform 1 können weitergehende Untersuchungen angestrebt werden. Besonders interessant ist hierbei die Frage nach der großen Diskrepanz bei der Aktivierung der Zimtsäure zwischen den strukturell sehr ähnlichen Enzymen *Sa4CL2* und *Ri4CL2*. Ob posttranslationale Modifikationen oder andere Faktoren einen Einfluss auf die *in vivo* Aktivität dieser 4CLs ausüben, wie es bereits für *Nicotiana tabacum* 4CL1 und 4CL2 diskutiert wurde (Lee und Douglas, 1996), ist ebenfalls offen. Hier würde eine genauere Kenntnis das Verständnis der Substratdiskriminierung von 4CLs erweitern. Dieses ist besonders wünschenswert, da bisher keine Kristallstrukturen von 4CLs zugänglich sind. Ferner kommt den 4CLs der Klasse I als zentrale Enzyme der Ligninbiosynthese eine wachsende Bedeutung in der Holzwirtschaft zu. „Metabolic engineering“ kann dabei zur gezielten Beeinflussung des Ligningehalts und der Ligninzusammensetzung in transgenen Bäumen genutzt werden. So wurde in antisense-4CL Pflanzen der Zitterpappel eine Reduktion des Ligningehalts um bis zu 45% erreicht. Bei gleichzeitiger Erhöhung des Cellulosegehalts wären solche transgene Bäume beispielsweise gut zur Herstellung von Zellstoff geeignet (Chiang, 2006). Auch durch die genaue Kenntnis der Mechanismen der Substratdiskriminierung von 4CLs im Zusammenhang mit den Möglichkeiten des metabolic engineering ließen sich in Zukunft die Qualität und die Ausbeute des Rohstoffes Holz optimieren.

Die einzige bislang bekannte pflanzliche Benzoat:CoA-Ligase (BZL) zeigt auf Aminosäurenebene nur eine Übereinstimmung von 18% gegenüber Sa4CL2 und Sa4CL3. Das aus *A. thaliana* stammende Enzym ist für die Biosynthese von benzoilyerten Glucosinolaten essentiell und weist *in vitro* eine Aktivierung von Benzoessäure auf (Kliebenstein et al., 2007). Auch wenn noch keine weiteren kinetischen Parameter verfügbar sind, so deuten diese Ergebnisse auf eine erste pflanzliche Benzoat:CoA-Ligase hin. Vergleicht man dieses Enzym auf phylogenetischer Ebene mit den 4CLs aus *A. thaliana*, so ist keine Ableitung der BZL aus 4CL erkennbar (Shockey et al., 2003). Vielmehr liegt eine unabhängige Evolution aus einer frühen Urform der Adenylat-bildenden Enzyme nahe. BZL bildet mit 13 weiteren Enzymen dieser Gruppe die Tribus VI in *A. thaliana*. Eine nahe Verwandtschaft der BZL besteht demnach zu At1g65890, welches keine Aktivität gegenüber aliphatischen Substraten zeigt (Shockey et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere Adenylat-bildende Enzyme der Tribus VI aus *A. thaliana* auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Benzoessäure zu aktivieren. Die Auswahl der Enzyme At1g21540 und At1g75960 erfolgte dabei durch Sequenzvergleich mit hoch konservierten Motiven bakterieller BZLs. Für beide heterolog exprimierten Enzyme konnten keine Aktivitäten gegenüber Benzoessäure oder Zimtsäurederivaten detektiert werden. Die Klonierungsversuche beider cDNAs waren darüber hinaus nur aus Blattgewebe erfolgreich. Benzoilyerte Glucosinolate sind jedoch vor allem Bestandteil der Samen von *A. thaliana* (Brown et al., 2003). Ein Zusammenhang mit der Biosynthese dieser Verbindungen ist daher unwahrscheinlich. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser Enzyme mit der nun bekannten BZL ergab nur eine Übereinstimmung von 44%. Das für bakterielle BZLs hoch konservierte Motiv (TATGKIQR) stimmt mit dem entsprechenden Motiv der pflanzlichen BZL (NGNGKILK) nur wenig überein, beinhaltet aber jeweils das in der Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme essentielle Lysin (At1g65880 Lys⁵⁴³). Ein Zusammenhang zwischen dem aus bakteriellen BZLs abgeleiteten Motiv und der Substratspezifität der BZL aus *A. thaliana* ist somit nicht gegeben.

3 Synthese

Die Synthese des Aucuparins (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybiphenyl) wurde erstmals von Nilsson und Norin (1963) vorgestellt. Die Autoren sind dabei von 5-Phenylcyclohexan-1,3-dion ausgegangen und stellten über Dehydrierung intermediär das 3,5-Dihydroxybiphenyl dar. Es folgten Methylierung und anschließend die Einführung der Hydroxyfunktion in Position 4 mittels *n*-Butyllithium und Oxidation durch Lithium-*tert*-butylhydroperoxid. Dieses Syntheschema ist für die Darstellung von in Position 3,4,5 unterschiedlich hoch methylierten Verbindungen umständlich, da nach Einbringung der Hydroxyfunktion eine erneute Methylierung stattfinden müsste.

In dieser Arbeit wurde daher das 3,4,5-Trihydroxybiphenyl als Ausgangsderivat für Methylierungsreaktionen gewählt. Dieses lässt sich leicht und in guter Ausbeute aus 5-Bromo-1,2,3-Trimethoxybenzol mit Phenylboronsäure über eine Suzuki-Kupplung darstellen (Miyaura et al., 1981). Diese Reaktion hat eine große Bedeutung bei der Synthese von unterschiedlichsten polychlorierten Biphenylen (PCBs) gewonnen (Lehmler und Robertson, 2001). Durch anschließende Etherspaltung mit Bortribromid und Wasser erhält man das 3,4,5-Trihydroxybiphenyl. Diese Verbindung ist durch die schwach sauren, phenolischen Hydroxyfunktionen leicht nachfolgenden Methylierungsreaktionen zugänglich. Für diesen Schritt bietet sich die Umsetzung mit Dimethylsulfat an. Es muss im Gegensatz zu Diazomethan nicht *in situ* dargestellt werden und hat einen deutlich geringeren Dampfdruck als das kompliziert handhabbare Methyljodid. Die Methylgruppen des Dimethylsulfats reagieren elektrophil mit deprotonierten Hydroxyfunktionen, wobei das Sulfation als Nukleophil eine gute Abgangsgruppe darstellt. Über diese Reaktion lassen sich in wässrig-alkalischem Milieu alle Hydroxyfunktionen des 3,4,5-Trihydroxybiphenyls methylieren. Es entsteht zunächst ein Gemisch aus mono- und dimethylierten Verbindungen, darunter auch das Aucuparin. Von den dimethylierten Verbindungen ist das 3-Hydroxy-4,5-dimethoxybiphenyl dem Aucuparin bevorzugt. Dieser Verlauf kann über das 3,4-Dihydroxy-5-methoxybiphenyl erklärt werden. Die mesomere Stabilisierung der deprotonierten Hydroxyfunktion in Position 4 resultiert in einer höheren Azidität, was wiederum eine nachfolgende Methylierung begünstigt.

Der Vorteil der beschriebenen Methode liegt in der parallelen Darstellung aller möglichen Methylierungsmuster des Edukts. Die Geschwindigkeit der Reaktion lässt sich in begrenztem Maße über die Temperatur, den pH-Wert und die Konzentration

des Dimethylsulfats beeinflussen. Auch eine Umsetzung im organischen Lösungsmittel ist möglich und wurde für die Methylierung von 2',4-Dihydroxy-3,5-dimethoxybiphenyl in Aceton beschrieben (Kokubun et al., 1995). Die Herausforderung der in dieser Arbeit beschriebenen Methode liegt in der Optimierung der Trennung und Isolierung der einzelnen Produkte. Die hier durchgeführte Isolierung des Aucuparins über Säulenchromatographie an Kieselgel 60 führt nur zu einer unbefriedigenden Ausbeute (> 0,5%), da vor allem die Abtrennung des Konstitutionsisomers schwierig ist. Ein instrumenteller Ansatz über präparative HPLC-Methoden wäre hier denkbar.

Das 3,4,5-Trihydroxybiphenyl sowie das 3,4-Dihydroxy-5-methoxybiphenyl sind für biochemische Untersuchungen der Aucuparin-Biosynthese wichtige Verbindungen. Sie können zur Aufklärung der enzymatischen Methylierung eingesetzt werden. Der Grundkörper des Aucuparins geht aus Benzoyl-CoA und drei Malony-CoA durch Katalyse der Biphenyl-Synthase (BIS) hervor. Das Produkt ist das 3,5-Dihydroxybiphenyl (Liu et al., 2004). Durch Oxidation der Position 4 und Methylierungen der Positionen 3 und 5 entsteht das Aucuparin. Diese Methylierungen sind vermutlich *O*-Methyltransferase(n)-katalysiert und sollten wie die BIS pathogeninduziert sein. Eine durch Infektion induzierte Naringenin-7-*O*-Methyltransferase wurde z.B. von Rakwal et al. (2000) für Reis beschrieben. Für die Charakterisierung der *O*-Methyltransferase(n) in *S. aucuparia* müssen entsprechende Substrate für biochemische Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die hier beschriebene Synthese der Biphenyl-derivate bietet dazu eine gute Möglichkeit.

IV. Material

1 Biologisches Material

1.1 Pflanzliche Zellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro*-Kulturen von *Centaurium erythraea*, *Sorbus aucuparia* und *Rubus idaeus* eingesetzt [Abbildung 47]. Die Zellsuspensionskulturen waren teilweise bereits in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Beerhues etabliert. Die *in vitro*-Kultur von *Rubus idaeus* wurde neu angelegt [V.1.1]. Suspensionskulturen wurden im Dunkeln auf LS-Medium (Linsmaier und Skoog, 1965) in 250 ml Erlenmeyerkolben bei konstant 24 °C und 180 rpm steril kultiviert. Zur Vermehrung und Erhaltung wurde je ein Ansatz alle 10 Tage auf zwei Erlenmeyerkolben mit 50 ml frischem Medium aufgeteilt.

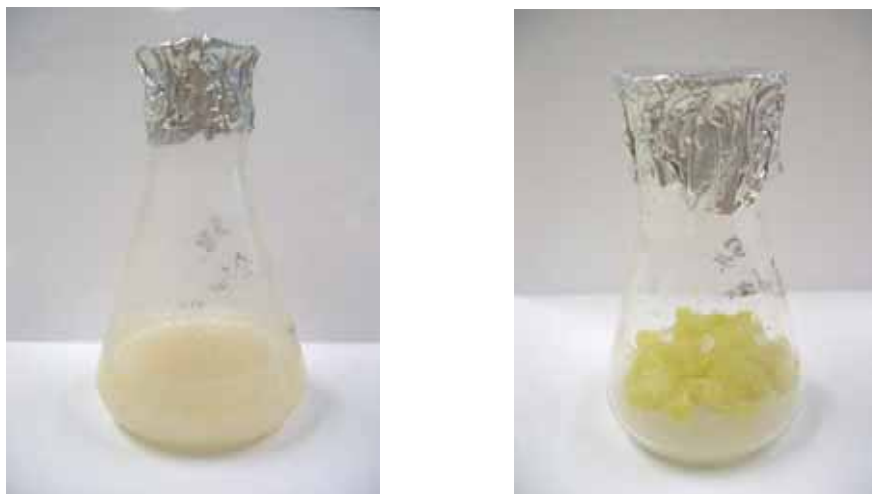


Abbildung 47: Zellsuspensionskultur von *Rubus idaeus* (li), Kalluskultur von *Sorbus aucuparia* (re)

1.2 Differenziertes Pflanzenmaterial

Von intakten *Sorbus aucuparia*-Pflanzen wurden verschiedene Organe eingesetzt. Blätter, Blüten, Knospen, Früchte und junge Triebe wurden dazu von einem ausgewachsenen Baum geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C für spätere Nukleinsäurepräparationen gelagert.

1.3 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und zur heterologen Expression von Proteinen wurden die folgenden *Escherichia coli*-Stämme und Plasmidvektoren verwendet.

1.3.1 Bakterienstämme

E. coli	relevante Eigenschaften
DH5 α	<i>F'</i> ϕ 80 δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15 end A1 hsdR17(rk-mk+)supE44 thi-1 λ-gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argFV169) deoR</i>
BL21(DE3)pLysS	<i>F' ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)</i>

1.3.2 Plasmidvektoren

Vektor	Eigenschaften/ Quelle
pGEM-T easy	3 kb T-Überhangvektor, <i>lacZ</i> , Ampicillinresistenz/ (Invitrogen)
pRSET B	2,9 kb Expressionsvektor, N-terminal 6xHIS zur Proteinreinigung, Ampicillinresistenz/ (Invitrogen)

2 Nukleinsäuren und Nukleotide

2.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) im Auftrag synthetisiert und bezogen.

Die verwendeten 3' CDS- und 5' CDS-Primer besitzen durch zwei variable Basen in der Position direkt hinter dem Oligo(dT)(N-1N) eine höhere Spezifität, um mit dem Anfang des poly(A)-Restes der mRNA zu hybridisieren (Liang und Pardee, 1992).

Degenerierte Oligonukleotide

Degenerierte Primer	
BOX1_4CL	5' -GGI ACI ACI GGI (CT)TI CCI AA(AG) GGI G- 3'
Anti 450aa	5' -CCI AT(AG) TCI CCI GT(AG) TGI A(AG)C CAI CC- 3'
CoA-ligase rev.	5' -TT(AG) CCI AT(CT) TCI TCI GGI ACI AC-3'
CoA- ligase fow.2	5' -CCI C(GT) (ATG) AT(AG) CA(AGT) AT(CT) TCI CC-3'

Genspezifische Oligonukleotide

Sa4CL1-spezifische Primer	
x1 Poly A1	5' -TTG CCA CGC AAC CAG CCT G- 3'
x1 Poly A2	5' -TGG TGC TTC TTT GCC ACG C- 3'

Sa4CL2-spezifische Primer	
x2 Poly A1	5' -GGT GCT TCG CTT CCG CGA- 3'
x2 Poly A2	5' -GCT TCG CTT CCG CGA AAT CAA G- 3'
x2 5-3	5' -TCG TTA CCA ACC CTT TGT GC- 3'
x2 5-4	5' -CGT CCT CAC TGT GGA AAT AC- 3'
X2 5-5	5' -GCA GAG AAA CAC TGA ATT GAG G- 3'
x2 5-9	5' -ACT TTT CTC AGT TTC CGC G- 3'
x2 5-10	5' -GAC GTC GTT TTT AAG TGC G- 3'
x2 5-11	5' -ACC TGG TCC ACG TAA GCC- 3'
Exp-x2 3 XhoI	5' -ATT CTC GAG CTA ATT GGG TAG GCT TGC- 3'
Exp-x2 5 NheI	5' -ATT GCT AGC ATG GAG CAC CAT CAC AAA G- 3'

Sa4CL3-spezifische Primer

Exp-x5 3	5' -GAA TTC TTA GGG CAG CGG TGG GGT TGC GGTG- 3'
Exp-x5 5	5' -ATG ATC TCC ATT GCT TCT AAT TCC GTT- 3'

Ri4CL2-spezifische Primer

Rubus2Exp-3 Kpn I	5' -ATT GGT ACC CTA ATT GGG TAG ACC TGC- 3'
Rubus2Exp-5 Nhe I	5' -ATT GCT AGC ATG GAG AAC AAA CAT CAA GAC G- 3'

Genspezifische Primer zur Expressionsanalyse

x1EA-3	5' -TTC GAT GAA AAA TAC TCG ATT TAT TC- 3'
x1EA-5	5' -TCC CAA CTT GTA TTA TAG CAC C- 3'
x2EA-3	5' -TCT GTG AAG AAA ACC CGA C- 3'
x2EA-5	5' -TCC GAA TTT GTA TTT CCA CAG T- 3'
x5EA-3	5' -ATG GAC AAA GTG CAC CTT GT- 3'
x5EA-5	5' -CAA ACC TCT ACT TGA AGG AG- 3'

Arabidopsis thaliana-spezifische Primer

3NP177724XhoI	5' -ACG TCT CGA GTT ACA TGT TTT TGG CAA TCT C- 3'
5NP177724NheI	5' -ACG TGC TAG CAT GCA AGA TTT GAA GCC AAG- 3'
3NP173573XhoI	5' -ACGTCT CGA GTT AAG GCA GAG ACT TAG C- 3'
5NP173573NheI	5' -ACG TGC TAG CAT GGA ACT CTT ACT TCC AC- 3'

Vektorspezifische Oligonukleotide

Vektorspezifische Primer

T7	5' -GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG- 3'
SP6	5' -GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC- 3'
pRSET B FOW	5' -GAG ACC ACA ACG GTT TCC CTC- 3'
pRSET B REV	5' -CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG- 3'

SMART II-RACE-Oligonukleotide

SMART II -RACE Primer

SMART II	5' -AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG- 3'
3' CDS	5' -AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T) ₃₀ N ₋₁ N- 3'
5' CDS	5' -(T) ₂₅ N ₋₁ N- 3'
RACE-Short	5' -CTA ATA CGA CTC ACT ATA AGG GC- 3'
RACE-Nested	5' -AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT- 3'
RACE-Long	5' -CTA ATA CGA CTC ACT ATA AGG GCA AGC AGT GGT AAC AAC GCA GAG T- 3'

3 Enzyme

<i>DNA-Synthese</i>	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	(Fermentas)
	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	(Fermentas)
	RevertAid™ H Minus M-MuLV RT	(Fermentas)
	PowerScript RT	(Clontech)
<i>Restriktion</i>	<i>Bsh</i> NI, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV, <i>Hin</i> 1I, <i>Kpn</i> I, <i>Nhe</i> I, <i>Tfi</i> I, <i>Xho</i> I	(Fermentas)
<i>weitere Enzyme</i>	T4-DNA-Ligase	(Fermentas)
	RNase A, RNase H	(Fermentas)

4 Kits für die Molekularbiologie

<i>RNA-Isolierung</i>	illustra QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit	(GE Healthcare)
	NucleoSpin RNA Plant	(Macherey-N.)
<i>DNA-Isolierung</i>	NucleoSpin Extract II	(Macherey-N.)
	NucleoSpin Plasmid	(Macherey-N.)
<i>Sequenzierung</i>	BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	(Appl. Biosystems)

5 Chemikalien und Reagenzien

5.1 Pflanzenzellkulturmaterial

alle Reagenzien in p.a. Qualität [IV.6.1]

5.2 Phytohormone

NAA	(Fluka)
2,4-D	(Fluka)
Kinetin	(Fluka)

5.3 Bakterienkulturmaterial

Agar-Agar	(Roth)
Pepton aus Casein	(Roth)
Hefeextrakt	(Roth)
Saccharose	(Fluka)
KH_2PO_4	(Roth)
K_2HPO_4	(Roth)
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	(Fluka)
Glycerin	(Roth)

5.4 Antibiotika

Substanz		[c] der Stammlösung
Ampicillin	(Fluka)	50 mg/ml dH ₂ O
Chloramphenicol	(Fluka)	35 mg/ml Ethanol pur.

5.5 Reagenzien für Biochemie und Molekularbiologie

DMSO	(Fluka)
IPTG	(Sigma Aldrich)
X-Gal	(Sigma Aldrich)
ATP	(Sigma Aldrich)
dNTPs	(Fermentas)
dThymin	(Fermentas)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer	(Fermentas)
Imidazol	(Roth)
Polyclar [®] AT	(Serva)
NaH ₂ PO ₄	(Roth)
Na ₂ HPO ₄	(Roth)
NaOCl 12%	(Roth)
Benzoessäure [7- ¹⁴ C]	(Hartmann Analytik)
Benzoyl-CoA	(Sigma Aldrich)
Coenzym A	(Sigma Aldrich)
Zimtsäure und deren Derivate	(Sigma Aldrich / Fluka)
Indikatorcocktail Lumasafe [™] Plus	(LUMAC LSC)

5.6 Reagenzien für die Gelelektrophorese

Agarose NEEO-Ultra	(Roth)
Ethidiumbromid	(Roth)
Harnstoff	(Bio-Rad)
TEMED	(Bio-Rad)
Acrylamid/ Bisacrylamid 30%	(Bio-Rad)
Ammoniumpersulfat	(Roth)
EDTA	(Sigma Aldrich)
Formamid	(Sigma Aldrich)
Tris	(Roth)

5.7 Reagenzien für die Synthese

5-Bromo-1,2,3-trimethoxybenzol	(Sigma Aldrich)
Phenylboronsäure	(Fluka)
Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium	(Sigma Aldrich)
Dimethylsulfat	(Sigma Aldrich)
Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm)	(Roth)

6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von Kulturmedien, Puffern und Lösungen wurde Reinstwasser verwendet. Sterilisation von Lösungen erfolgte im Autoklaven für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2 bar. Antibiotika und andere temperaturlabile Komponenten wurden sterilfiltriert und dann zu abgekühlten Lösungen dazugegeben. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

6.1 Medien für Pflanzenzellkulturen

<i>LS-Medium</i> (Linsmaier und Skoog, 1965)	NH ₄ NO ₃	1650 mg/l
	KNO ₃	1900 mg/l
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	370 mg/l
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	440 mg/l
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	41,3 mg/l
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8 mg/l
	H ₃ BO ₃	6,2 mg/l

Fortsetzung auf der nächsten Seite

	MnSO ₄ x H ₂ O	16,9	mg/l
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	10,6	mg/l
	KJ	0,83	mg/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	mg/l
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	25	µg/l
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	2,5	µg/l
	Myo-Inosit	100	mg/l
	Thiaminchlorid-HCl	10	mg/l
	2,4-D	0,9	µg/l
	NAA	1,04	µg/l
	Saccharose	30	g/l
<i>20x MS-Makro-Salze</i>	NH ₄ NO ₃	33	g/l
	KNO ₃	38	g/l
	MgSO ₄ x 2H ₂ O	7,4	g/l
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	8,8	g/l
	K ₂ HPO ₄	3,4	g/l
<i>1000x MS-Micro-Salze</i>	H ₃ BO ₃	6,2	g/l
	MgSO ₄ x H ₂ O	16,9	g/l
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	g/l
	KJ	0,83	g/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	g/l
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	25	mg/l
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	2,5	mg/l
<i>200x Fe-EDTA</i>	NaFe(III) EDTA	7,46	g/l
<i>1000x MS-Vitamine</i>	Nikotinsäure	0,5	g/l
	Thiamin-HCl	0,1	g/l
	Pyridoxal-HCl	0,5	g/l
	myo-Inosit	100	g/l

<i>MS-Medium</i> (Murashige und Skoog, 1962)	Saccharose	20	g/l
	20x MS-Makro-Salze	50	ml/l
	1000x MS-Mikro-Salze	1	ml/l
	200x Fe-EDTA	5	ml/l
	1000x MS-Vitamine	1	ml/l
	Glycin	2	mg/l
	2,4-D	2	mg/l
	Kinetin	0,2	mg/l
	pH 5,7		
	Festmedium: 1 % Agar		

6.2 Medien für Bakterienkulturen

<i>LB-Medium</i> (Sambrook und MacCallum, 2001)	Pepton aus Casein	10	g/l
	Hefeextrakt	5	g/l
	NaCl	10	g/l
	pH 7,0-7,2		
	Festmedium: 1,5 % Agar		
<i>SOC-Medium</i>	Pepton aus Casein	20	g/l
	Hefeextrakt	5	g/l
	1 M NaCl	10	ml/l
	1 M KCl	2,5	ml/l
	autoklavieren, dann hinzufügen		
	2 M Mg ²⁺ Stammlösung	10	ml/l
	2 M Glucose	10	ml/l
dH ₂ O		ad 100 ml	
<i>2 M Mg²⁺ Stammlösung</i>	MgCl ₂ x 6H ₂ O	20,33	g
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	24,56	g
	dH ₂ O		ad 100 ml
<i>TB-Medium</i>	Pepton aus Casein	12	g/l
	Hefeextrakt	24	g/l
	KH ₂ PO ₄	2,13	g/l
	K ₂ HPO ₄	12,54	g/l

6.3 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese

6.3.1 DNA-Auftrennung

<i>50x TAE-Puffer</i>	Tris	2	M
	EDTA	0,05	M
	pH 8 mit Eisessig eingestellt		
<i>TBE-Puffer</i>	Tris	90	mM
	Borsäure	90	mM
	EDTA	2	mM
<i>Ladepuffer zum Sequenzieren</i>	25 mM EDTA	1	ml
	Formamid	5	ml
	Dextranblau	0,1	mg
<i>Sequenziergel</i>	Harnstoff	9	g
	10x TBE-Puffer	3	ml
	dH ₂ O	11,5	ml
	Acrylamid/ Bis. 30%	3,75	ml
	TEMED	0,01	ml
	10% (w/v) APS	230	µl

6.3.2 Proteinauftrennung (SDS-PAGE)

<i>Sammelgel (4%)</i>	dH ₂ O	3,0	ml
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,3	ml
	Acrylamid/Bis. 30 %	0,65	ml
	10 % (w/v) SDS	0,05	ml
	10 % (w/v) APS	0,1	ml
	TEMED	5	µl

<i>Trenngel (12%)</i>	dH ₂ O	3,3 ml
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
	Acrylamid/Bis. 30 %	4,0 ml
	10 % (w/v) SDS	0,05 ml
	10 % (w/v) APS	0,1 ml
	TEMED	5 µl

<i>Probenpuffer</i>	dH ₂ O	2,7 ml
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,0 ml
	Glycerin	2,0 ml
	10 % (w/v) SDS	3,3 ml
	β-Mercaptoethanol	0,5 ml
	0,5 % (w/v) Bromphenolblau	0,5 ml

<i>10x Elektrophorese- puffer</i>	Tris	15 g
	Glycin	72 g
	Na-SDS	5 g
	dH ₂ O	ad 500 ml

<i>Färbelösung</i>	Coomassieblau R250- Stammlösung	25 ml
	Methanol	100 ml
	Essigsäure	20 ml
	dH ₂ O	ad 200 ml

<i>Coomassieblau R250- Stammlösung</i>	Coomassieblau R250	0,5 g
	Methanol	50 ml

<i>Entfärber</i>	Methanol	30 ml
	Essigsäure	20 ml
	dH ₂ O	ad 200 ml

6.4 Puffer zur Enzymreinigung

<i>Tris-Puffer</i>	Tris pH 7,5	100	mM
<i>Bindepuffer</i>	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol pH 7,4	20 500 30	mM mM mM
<i>Elutionspuffer</i>	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol pH 7,4	20 500 500	mM mM mM

6.5 Puffer zur Plasmidisolierung

<i>Puffer P1</i>	Tris-HCl EDTA RNase A RNase A vor Gebrauch hinzugefügt	50 10 100	mM mM µg/ml
<i>Puffer P2</i>	NaOH SDS 1 % (w/v)	0,2	M
<i>Puffer P3</i>	Kaliumacetat	2,55	M
<i>TE-Puffer</i>	Tris-HCl EDTA pH 8	10 1	mM mM

6.6 Sonstige Puffer und Lösungen

<i>IPTG-Lösung</i>	IPTG	6 g
	dH ₂ O	ad 500 ml
<i>X-Gal</i>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid	100 mg
	N,N'-Dimethylformamid	2 ml
<i>Bradford-Reagenz</i>	Coomassie-Brilliantblau G250	100 mg
	Ethanol 96 %	50 ml
	Phosphorsäure 85 %	100 ml
	dH ₂ O	ad 1000 ml
<i>Extraktionspuffer für Zellrohextrakte</i>	KH ₂ PO ₄	1,36 g
	DTT	15,4 mg
	dH ₂ O	ad 100 ml

7 Geräte

<i>Autoklav</i>	Vapoklav	(Sterico)
<i>FPLC</i>	Biologic System	(Bio-Rad)
	Controller	(Bio-Rad)
<i>Elektrophorese</i>	Sub Cell-GT	(Bio-Rad)
	Mini-Sub Cell	(Bio-Rad)
	Proteinkammer	(Biometra)
<i>GC-MS-Analytik</i>	Gaschromatograph 6890	(Agilent)
	Massenspektrometer JMS-T100GC	(JOEL)
<i>HPLC-Analytik</i>	1525 Binary HPLC Pump	(Waters)
	2487 Dual λ Absorbance Detector	(Waters)
<i>IR-Analytik</i>	Bruker Tensor 27	(Bruker)
<i>NMR-Analytik</i>	Kernresonanz- spektrometer DRX-400	(Bruker)
<i>MS-Analytik</i>	3200 Q TRAP	(Appl. Biosystems)
<i>Photometer</i>	UV-Mini 1240	(Shimadzu)
<i>PCR-Cycler</i>	T-Professional Gradient	(Biometra)
<i>Geldokumentation</i>	MultiImage™ Light Cabinet	(Alpha In. Corp.)
<i>pH-Meter</i>	pH 325	(WTW)
<i>Reinstluft</i>	LiminAir HLB 2472	(Heraeus)
<i>Reinstwasser</i>	arium 611	(Satorius)
<i>Rotationsverdampfer</i>	Laborota 4000-efficient	(Heidolph)
<i>Schüttler</i>	HT	(Infors)
<i>Sequenzierer</i>	ABI Prism 377	(Appl. Biosystems)
<i>Spannungsgeber</i>	Power Pac 300	(Bio-Rad)
<i>Szintillationszähler</i>	PW 4700	(Philips)
<i>Temperierung</i>	Dri-Block DB 3D	(Techne)
	Exatherm U3	(Julabo)
<i>Vakuumkonzentrator</i>	Genevac SF50	(Biometra)
<i>Waagen</i>	Analysen- und Feinwaagen	(Satorius)
<i>Zentrifugen</i>	Universal 32 R	(Hettich)
	Biofuge 13	(Heraeus)

V. Methoden

1 Zellkulturtechniken

1.1 Anlegen von Pflanzenzellkulturen

Für das Arbeiten mit *in vitro*-Pflanzenmaterial standen in der Arbeitsgruppe bereits Suspensionskulturen von *Centaurium erythraea* und *Sorbus aucuparia* zur Verfügung. Eine solche Kultur wurde von *Rubus idaeus* neu angelegt. Dazu wurden zunächst frische Sprosse der Himbeere aus dem Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie (TU Braunschweig) geerntet. Diese Sprosse wurden in etwa 3 cm lange Sprosstücke geschnitten und nacheinander mit Ethanol 70 % (v/v) und NaOCl-Lösung 3 % oberflächensterilisiert. Die so behandelten Pflanzenteile wurden auf MS-Medium [IV.6.1] ausgelegt und unter Lichtwechsel (16 h hell/ 8 h dunkel) bei 24 °C kultiviert. Der sich aus den Schnittflächen gebildete Kallus wurde weiter auf festem LS-Medium [IV.6.1] vermehrt und schließlich ca. 1 g Kallusgewebe in 50 ml flüssiges LS-Medium als Suspensionskultur überführt. Die nun unter Lichtausschluss auf einem Schüttler geführte Suspensionskultur wurde unter sterilen Bedingungen etwa alle 10 Tage auf frisches Medium aufgeteilt.

1.2 Elizitierung von *in vitro*-Pflanzenzellkulturen

Durch Elizitierung von intakten Pflanzen und Gewebekulturen lassen sich Stoffwechselforgänge beeinflussen. So können durch bestimmte Elizitoren z.B. Abwehrmechanismen angeregt (Turner et al., 2002) und die neue oder vermehrte Bildung von Sekundärmetaboliten induziert werden (Dixon und Pavia, 1995). Pflanzenzellkulturen wurden durch Zugabe verschiedener Elizitoren zur vermehrten bzw. Neubildung von Sekundärmetaboliten angeregt [Tabelle V-1].

Tabelle V-1: Elizitoren und Zellkulturen

Elizitor	Zellkultur	Quelle
Methyljasmonat [100 µmol/l]	<i>S. aucuparia</i> <i>C. erythraea</i>	(Beerhues und Berger, 1995)
Hefeextrakt [3 g/l]	<i>S. aucuparia</i> <i>C. erythraea</i>	(Liu et al., 2004) (Beerhues und Berger, 1995)
<i>Venturia inaequalis</i> - Extrakt [3 g/l]	<i>S. aucuparia</i>	(Hrazdina und Borejsza- Wysocki, 2003)
Chitosan [25 mg/l]	<i>S. aucuparia</i> <i>R. idaeus</i>	(Villegas et al., 1990)

Die Elizitor-Stammlösungen wurden unter Sterilbedingungen hergestellt und den Suspensionskulturen am fünften Wachstumstag in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

2 Methoden der Protein- und Biochemie

2.1 Zellfreie Extrakte aus Pflanzenmaterial

Zellfreie Proteinextrakte wurden aus Suspensionskulturen von *Centaurea erythraea* gewonnen. Die Zellkulturen wurden dazu am fünften Wachstumstag mit Methyljasmonat [V.1.2] behandelt und nach weiteren 15 h durch Vakuumfiltration geerntet. Um phenolische Verbindungen abzutrennen, die unerwünschte Interaktionen mit Proteinen eingehen können, wurden etwa 4 g Zellen mit 400 mg Polyclar® AT versetzt. Dieses Gemisch wurde in 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,5; 1 mM DTT) mit Seesand in einem Mörser homogenisiert. Die erhaltene Masse wurde bei 9.000 rpm unter Kühlung zentrifugiert und der Überstand für Inkubationen eingesetzt.

2.2 Shikimat-Dehydratase-Ansatz

Zellfreie Extrakte der Suspensionskulturen von *Centaurea erythraea* [V.2.1] wurden für eine Shikimat-Dehydratase-Inkubation nach folgender Aufstellung [Tabelle V-2] in einem 250 µl-Ansatz eingesetzt:

Tabelle V-2: Shikimat-Dehydratase-Ansatz

Komponente	Konzentration	Volumen
Shikimisäure	[20 mM]	5 µl
ATP	[125 mM]	5 µl
MgCl ₂	[125 mM]	5 µl
Proteinextrakt		50 µl
Kalium-Phosphatpuffer	[0,1 M]	ad 250 µl

Die Inkubation wurde nach 60 min bei 35 °C durch Zugabe von 3 M Trichloressigsäure abgestoppt und zweimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Trockne eingengt, in 50 µl Methanol aufgenommen und der HPLC-Analyse unterworfen. Eine gleichbehandelte, jedoch zuvor thermisch denaturierte Proteinlösung diente als Negativkontrolle.

2.3 Acetonextraktion von Pflanzenmaterial

Zellkulturen von *Centaurea erythraea* wurden zur Analyse der gebildeten Sekundärmetabolite mit Aceton extrahiert. 5 g vakuumfiltrierte Zellen wurden in einem Mörser mit Seesand und 5 ml Aceton zur Homogenität verrieben und die Masse anschließend filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis auf den wässrigen Rückstand eingengt und dieser mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockne eingengt und in Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde mittels HPLC und GC-MS analysiert [V.5].

2.4 Zellaufschluss bakterieller Expressionssysteme

In *E. coli* heterolog exprimierte Proteine wurden mittels Ultraschall aus den Bakterien freigesetzt. Das abzentrifugierte Bakterienpellet wurde dazu in 4 ml Bindepuffer [IV.6.4] aufgenommen, zur Homogenität gevortext und dann mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Überstand nach erneuter Zentrifugation wurde entweder direkt für Inkubationen eingesetzt (Rohextrakt) oder weiter aufgereinigt [V.2.5].

2.5 Reinigung rekombinanter Proteine

Rekombinante Proteine mit einem terminalen Polyhistidinrest (6xHis-Tag) können über Affinitätschromatographie an HisTrapTM-Säulen (GE Healthcare) gereinigt werden. Die Chromatographie beruht auf der Chelatbildung von Histidinresten mit an einer Sepharosematrix gebundenen Ni^{2+} -Ionen. Durch hohe Konzentrationen an Imidazol im Elutionspuffer lassen sich adsorbierte Proteine wieder von der Säule eluieren.

Die Säule wurde mit 5 ml Bindepuffer [IV.6.4] äquilibriert. Dann wurden 2 ml des unter [V.2.4] gewonnenen Rohextraktes auf die Matrix aufgebracht, mit 4 ml Bindepuffer gewaschen und das rekombinante Protein anschließend mit 2 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die so gewonnene Proteinlösung konnte abschließend über eine PD₁₀-Säule (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers entsalzt werden und wurde mit gleichen Teilen Glycerin bei -20 °C gelagert oder direkt für Inkubationen verwendet.

2.6 CoA-Ligase-Ansatz

Rekombinante CoA-Ligasen wurden nach folgender Aufstellung [Tabelle V-3] inkubiert. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur statt (Kumar und Ellis, 2003) und wurde bei produktspezifischen Wellenlängen für die gebildeten CoA-Ester (Gross und Zenk, 1966) UV-photometrisch verfolgt (Knobloch und Hahlbrock, 1977).

Tabelle V-3: CoA-Ligase-Ansatz

Komponente	Konzentration	Volumen/ Masse
Substrat	[10 mM]	20 µl
ATP	[125 mM]	20 µl
MgCl ₂	[125 mM]	20 µl
Coenzym A	[10 mM]	20 µl
Protein		4 µg *
Tris-Puffer	[0,1 M]	ad 1000 µl

Als Substrate wurden *p*-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, Sinapinsäure und Zimtsäure eingesetzt. Für Aktivitätsbestimmungen aus bakteriellen Rohextrakten wurden jeweils 50 µl verwendet *.

2.6.1 Inkubationen mit radioaktiv markiertem Substrat

CoA-Ligase-Ansätze wurden zusätzlich mit radioaktiv markierter Benzoesäure [7 - ¹⁴C] durchgeführt [Tabelle V-4]. Die Gesamtradioaktivität im Ansatz betrug 5.000 cpm. Die Inkubation dauerte bei Raumtemperatur 30 min an und wurde mit 3 M Trichloressigsäure abgestoppt. Radioaktiv markierte Benzoesäure wurde durch zweimalige Extraktion mit 100 µl Ethylacetat entfernt. 10 µl der wässrigen Phase wurden mit 3 ml Indikatorcocktail gemischt. Diese Lösung wurde im Szintillationszähler auf gebildeten Benzoyl-CoA-Ester untersucht.

Tabelle V-4: Benzoat:CoA-Ligase-Ansatz mit radioaktivem Substrat

Komponente	Konzentration	Volumen
Benzoessäure [$7 - ^{14}\text{C}$]	50.000 cpm	10 μl
ATP	[125 mM]	25 μl
MgCl ₂	[125 mM]	25 μl
Coenzym A	[10 mM]	25 μl
Protein		10 μl
Tris-Puffer	[0,1 M]	ad 100 μl

Als Positivkontrolle diente eine heterolog exprimierte BZL aus *Rhodopseudomonas palustris* (Beuerle und Pichersky, 2002).

2.6.2 Reinigung von enzymatisch gebildetem Produkt

p-Cumaroyl-CoA wurde über Festphasenextraktion an C₁₈-Umkehrphase gereinigt. Dazu wurde eine LC-18 Säule (Supelco, 1 g) mit jeweils 5 Säulenvolumina Methanol, dH₂O und 4% Ammoniumacetatlösung gewaschen und äquilibriert. Nach Inkubation [V.2.6] wurde der Reaktionsansatz mit gleichem Volumen 8% Ammoniumacetatlösung versetzt und auf die Säule aufgetragen. Es wurde mit 4% Ammoniumacetatlösung bis zur Abwesenheit von freiem Coenzym A gewaschen und der CoA-Ester mit dH₂O eluiert (Beuerle und Pichersky, 2002). Fraktionen, die *p*-Cumaroyl-CoA enthielten, wurden mittels MS analysiert [V.5.3].

2.7 Bestimmung kinetischer Parameter

Zur Bestimmung kinetischer Daten wie K_M , K_{cat} und V_{max} wurden 4 μg rekombinanten Proteins mit verschiedenen Substratkonzentrationen inkubiert und die Absorptionsänderung über die Zeit t UV-photometrisch verfolgt. Es wurden Substratkonzentrationen von $0,2 - 5 \times K_M$ gewählt, wobei das zweite Substrat bzw. ATP jeweils in Sättigungskonzentration eingesetzt wurde. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur und pH-Optimum durchgeführt. Das Volumen der Inkubation betrug jeweils 1 ml [V.2.6]. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software UV-Probe 2.10 (Shimadzu).

Ergebnisse sind Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Einzelbestimmungen.

2.8 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt einer Lösung wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dabei verschiebt sich in sauren Lösungen das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brillantblau G250 in Gegenwart von Proteinen von 465 nm auf 595 nm. Dieser Effekt ist nur begrenzt linear an einen Konzentrationsbereich gekoppelt. Eine Kalibrierung mit BSA als Standard wurde durchgeführt. Für die Messung unbekannter Proteingehalte wurde eine der Kalibrierung entsprechende Menge der zu vermessenden Lösung mit Reinstwasser auf 100 μ l aufgefüllt und mit 900 μ l Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm vermessen und der Gehalt anhand der Kalibrierung ermittelt.

2.9 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-PAGE lassen sich unter denaturierenden Bedingungen Aussagen über die Größe von Proteinuntereinheiten machen (Laemmli, 1970). Dazu wurden 5 μ g des zu bestimmenden Proteins in Probenpuffer bei 95 °C für 5 min denaturiert und auf die Gelmatrix aufgetragen. Es wurde ein diskontinuierliches Trennsystem mit 4 % Sammelgel und 12 % Trenngel verwendet. Die Elektrophorese im Sammelgel erfolgte bei 35 mA, die Trennung im Trenngel bei 45 mA. Die Detektion erfolgte durch Färbung des Trenngels in Coomassie-Färbelösung für 60 min und Entfärbung über Nacht [IV.6.3.2]. Als Referenz dienten gleichbehandelte Größenmarker (Fermentas).

Durch Auftragung des R_f -Wertes der Proteine des Größenmarkers gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen Molekülmassen erfolgte eine Kalibrierung. Aus der erhaltenen Kalibriergeraden konnte die Molekülmasse einer unbekannt Proteinuntereinheit über den R_f -Wert bestimmt werden.

2.10 Gelfiltration von Proteinen

Bei der Gelfiltration handelt es sich um eine Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC). Dabei werden Proteine mit höheren Molekülmassen weniger stark retiniert als Proteine mit geringeren Molekülmassen. Diese dringen tiefer in Poren der Gelmatrix ein und werden so zurückgehalten.

Die Gelfiltration wurde über eine HiPrep 16/60 Sephacryl S 200 HR-Säule (GE Healthcare) mit Hilfe der FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) durchgeführt. Es wurden Standardproteine bekannter Molekülmassen für eine Kalibrierung verwendet. Die Trennung erfolgte in 0,05 M NaH₂PO₄-Puffer (pH 7,5) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min. Die Elution der Proteine wurde über einen UV-Detektor bei $\lambda=280$ nm verfolgt. Die Abschätzung der relativen Molekülmasse des nativen Proteins erfolgte analog [V.2.9] über das relative Elutionsvolumen.

2.11 Berechnung der Molekülmassen von Proteinen

Molekülmassen von Proteinen lassen sich einerseits experimentell ermitteln, bei bekannter Aminosäuresequenz jedoch auch aus den Massen der einzelnen Aminosäuren berechnen. Die Berechnung erfolgte über EditSeq 4.00 (DNASTAR).

3 Methoden der Molekularbiologie

3.1 Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme [IV.1.3] wurden in Dauerkulturen bei -80 °C als 20 % Glycerin-/ LB-Medium-Mischungen gelagert. Zur Aufzucht und Transformation wurden Aliquote dieser Kulturen auf festem LB-Medium ausplattiert und einzelne Kolonien weiter verwendet. Die Aufzucht bereits kompetenter Zellen erfolgte nach Transformation zunächst auf SOC-Medium. Für Übernachtskulturen wurden die transformierten Bakterien auf festem LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausgestrichen und einzelne Kolonien weiter in 5 ml flüssigem LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Diese Kulturen wurden für die Plasmidisolierung eingesetzt. Kulturen für die heterologe Expression wurden auf TB-Medium bei 37 °C angezogen und nach Induktion der Expression bei 22 °C auf einem Schüttler geführt. Transformierte *E. coli*-Kolonien konnten auf festem LB-Medium mit Selektionsantibiotikum bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*

Die beschriebenen Bakterienstämme [IV.1.3] wurden nach der Calciumchloridmethode für die Transformation kompetent gemacht (Mandel und Higa, 1970). Von einer ausplattierten Dauerkultur wurde eine Kolonie über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und von dieser 1 ml in 50 ml frisches Medium überführt. Bei einer Konzentration von OD₆₀₀ 0,6-0,8 wurden die Bakterien in einem Falcon-Röhrchen bei 3.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und mit 50 ml einer eiskalten 0,05 M CaCl₂-Lösung gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 20 ml der CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Lösung weitere 20 min auf Eis gehalten. Es wurde wieder zentrifugiert und das Pellet in 940 µl 0,05 M CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden der Lösung 140 µl Glycerin hinzugesetzt, die Mischung in 50 µl-Aliquote aufgeteilt und diese bei -80 °C bis zur Transformation gelagert.

3.3 Design von Oligonukleotiden

Oligonukleotide als Primer für die cDNA-Synthese und für die PCR wurden von der Firma MWG-Biotech (Erlangen) synthetisiert. Die Primer wiesen eine Länge von 18-25 Nukleotiden auf und wurden so gewählt, dass die Schmelztemperatur möglichst bei 55-65 °C und der GC-Gehalt bei 45-55 % lagen. Primer für die Fragmentsuche waren entweder durch Mischbasen oder Inosin degeneriert. Mischbasen werden durch anteiliges Vorkommen der Nukleotide bei der Synthese eingeführt und sind in Klammern dargestellt [IV.2.1]. Inosin wird eingesetzt, um mit A, C, G oder T zu hybridisieren (Case-Green und Southern, 1994). Der Vorteil von Inosin liegt im resultierenden niedrigeren Degenerationsgrad der Primer. Dieser berechnet sich durch die Anzahl der möglichen Basen in einer degenerierten Position. Alle Werte für diese Positionen eines Primers werden miteinander multipliziert. Der Degenerationsgrad sollte 512 nicht überschreiten. Inosin erhält den Faktor 1.

3.3.1 Restriktionsschnittstellen in Expressionsprimern

Primer für die Amplifikation von offenen Leserahmen (ORF) wurden bei der Synthese mit Restriktionsschnittstellen unter Einhaltung des Leserasters versehen. Diese Restriktionsschnittstellen wurden der jeweiligen MCS des Expressionsvektors für eine gerichtete Ligation angepasst und waren am 5'-Terminus durch drei angehängte Nukleotide geschützt.

3.4 Isolierung von RNA

3.4.1 Isolierung von poly(A⁺)-RNA

Poly(A⁺)-RNA zur Synthese von cDNA wurde aus Suspensionskulturen von *Sorbus aucuparia* gewonnen. Die Zellkulturen wurden eliziert [V.1.2] und die Zellen nach 15 h durch Vakuumfiltration geerntet. 250 mg der so erhaltenen Zellen wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zermahlen und 100 mg des feinen Pulvers für die mRNA-Gewinnung mit Hilfe des illustra QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kits [IV.4] eingesetzt.

Diese Methode beruht auf Tensidlyse des Zellmaterials und Adsorption an eine Cellulose-oligo(dT)-Affinitätsmatrix. RNasen werden dabei durch Guanidiniumthiocyanat inhibiert. An Matrix gebundene poly(A⁺)-RNA wird nacheinander mit hoch

und niedrig konzentrierten Puffern gewaschen und schließlich eluiert. Die so gewonnene poly(A⁺)-RNA wurde direkt für die reverse Transkription verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

3.4.2 Isolierung von gesamt-RNA

Die Isolierung von gesamt-RNA wurde sowohl aus Suspensionskulturen als auch aus nativem Pflanzenmaterial mit Hilfe des NucleoSpin RNA Plant Kits [IV.4] durchgeführt. Dazu wurde Zellmaterial mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. 100 mg des Pulvers wurden in Extraktionspuffer gelöst, durch Filtration von zellulären Bestandteilen befreit und an eine Kieselgelmatrix adsorbiert. Nach Verdau von DNA durch DNase I wurde die RNA auf der Matrix gewaschen und abschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die gewonnene gesamt-RNA wurde direkt für die reverse Transkription eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

3.5 Reverse Transkription

3.5.1 cDNA-Synthese mittels SMART-RACE-Verfahren

Die unter [V.3.4] gewonnene poly(A⁺)-RNA oder gesamt-RNA wurde für die Erststrang-cDNA-Synthese verwendet. Das SMART-RACE-Verfahren beinhaltet eine Ankerprimer-Technik, die sich in den eingesetzten 3' CDS- und SMART II-Primern widerspiegelt. Als Gegenstück dienen entsprechende genspezifische Primer. Für die Reaktion wurden 2-4 µl RNA als Matrize verwendet und diese mittels PowerScript RT [IV.3] bei 42 °C in cDNA transkribiert.

Das Enzym basiert auf einer Moloney- Murine Leukemia Virus-Reversen Transkriptase (M-MuLV-RT). Die Terminal-Nukleotid-Transferase-Aktivität (TdT) der PowerScript RT erlaubt dabei die Verlängerung der Matrizen-RNA um den SMART II-Primer durch Anfügen von Desoxycytidinresten an die neu gebildete cDNA. Die so um eine bekannte Sequenz 5'-terminal erweiterte cDNA kann für die 5'-RACE-PCR verwendet werden.

cDNA-Synthese mittels 3' CDS-Primer wurde für die Aufklärung der 3'-Termini mit Hilfe der 3'-RACE-PCR durchgeführt. Als 3'-CDS-Primer diente ein um die SMART II- Sequenz erweiterter oligo(dT)-Primer.

Reaktionskomponenten für die reverse Transkription wurden nach Angaben des Herstellers (Clontech) eingesetzt.

3.5.2 cDNA-Synthese mittels H Minus M-MuLV RT

Erststrang-cDNA-Synthese wurde darüber hinaus mit einer reversen Transkriptase ohne (TdT)-Aktivität durchgeführt. Die RNase-Aktivität dieses Enzyms war durch eine Punktmutation in der H-Domäne unterbunden. Für die cDNA-Synthese wurden bis zu 10 µl gesamt-RNA verwendet und die Reaktion wurde mit degenerierten oder genspezifischen Primern nach Angaben des Herstellers (Fermentas) durchgeführt. Um Störungen der PCR durch RNA-Reste zu vermeiden, wurde der Ansatz nach abgeschlossener Reaktion mit *E. coli* RNase H für 20 min bei 37 °C inkubiert. So gewonnene cDNA wurde für die Fragmentsuche mit degenerierten Primern und für RT-PCR Experimente zur Expressionsanalyse herangezogen.

3.6 Polymerasekettenreaktion (PolymeraseChainReaction)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Die DNA-Polymerasen bedienen sich dazu einer kurzen Oligonukleotidsequenz, die sich an den komplementären Zielstrang anlagert. Dann knüpfen sie an bestehende freie 3'-OH Funktionen der Desoxyribose komplementäre Nukleotide, analog der semikonservativen DNA-Replikation. Als Startsequenzen finden Primer von 18-25 Nukleotiden Länge Anwendung. Sowohl längere als auch kürzere Primersequenzen zeigen geringere Spezifitäten, die sich durch „mispriming“ oder Bildung von Haarnadeln ausdrücken können. Als Matrize für die PCR können cDNA, genomische DNA oder Plasmid-DNA eingesetzt werden. DNA-Polymerasen für die PCR werden aus thermoresistenten Organismen gewonnen und von verschiedenen Anbietern rekombinant hergestellt. Man unterscheidet DNA-Polymerasen ohne Exonukleaseaktivität (z.B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) von sogenannten Proofreading-Polymerasen (z.B. *Pfu*-, *Pfx*-, *Pwo*-Polymerase). Letztere weisen die geforderte Exonukleaseaktivität auf und werden daher z.B. für DNA-Amplifikationen mit anschließender Klonierung in Expressionsvektoren eingesetzt. Ihre Fähigkeit fehlerhaft verknüpfte Nukleotide zu erkennen und auszutauschen drückt sich in einer sehr geringen Fehlerrate aus.

Standard-PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt [Tabelle V-5]:

Tabelle V-5: Standard-PCR-Ansatz

Komponente	Volumen
Matrizen-DNA	1 µl
Primer sense [10 pmol/µl]	1 µl
Primer antisense [10 pmol/µl]	1 µl
dH ₂ O	12 µl
Diese Mischung wurde dem ersten Denaturierungsschritt unterworfen. Als „Mastermix“ wurden dann hinzugefügt:	
10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl
Polymerase [5 units/µl]	0,1 µl
dH ₂ O	3,9 µl

Ein Standardtemperaturprogramm für die PCR mit *Taq*-Polymerase zeigt Tabelle V-6.

Tabelle V-6: Standard-PCR-Programm

Schritt	Temp. [°C]	Zeit [sec]	Zyklen zu Schritt	Beschreibung
1	94	180		Denaturierung
2	70	(pause)		Hot-Start
3	94	90		Denaturierung
4	55	45		Anlagerung
5	72	120	30 x zu Schritt 3	Elongation
6	72	600		Finale Elongation
7	8	(pause)		Stopp

Die Standardbedingungen entsprechen einer Hot-Start-PCR. Diese Vorgehensweise gewährleistet eine möglichst hohe Spezifität der Reaktion.

Die Denaturierung erzwingt eine Aufspaltung der doppelsträngigen Matrizen-DNA in DNA-Einzelstränge. Die Anlagerungstemperaturen der Primer wurden 3-10 °C unterhalb ihrer Schmelztemperaturen gewählt. Bei Verwendung von *Pfu*-Polymerase wurde die Elongation bei 68 °C für 4 min durchgeführt, die terminale Elongation für 20 min.

Die Reaktionsbedingungen wurden ausgehend von diesen Standardangaben variiert, um Einflussgrößen wie Fragmentlänge, Primersequenz und Matrizenqualität zu berücksichtigen.

Die Schmelztemperatur T_S von Oligonukleotiden lässt sich wie folgt berechnen:

$$T_S = (N_A + N_T) * 2 \text{ °C} + (N_C + N_G) * 4 \text{ °C}$$

A, C, G und T bezeichnen die Nukleotide.

3.6.1 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Die RACE-Technik stellt eine PCR-Methode zur Identifizierung unbekannter 3´- und 5´-Regionen von cDNA-Fragmenten dar (Frohman et al., 1988). Das Verfahren beruht auf einer Verknüpfung der cDNA-Enden mit einem Ankerprimer, welcher während der cDNA-Synthese eingeführt wird [V.3.5.1]. Diese artifiziellen Enden können während der PCR mit RACE-Primern und einem genspezifischen Primer zur Aufklärung des offenen Leserahmens (ORF) genutzt werden.

Diese Art der PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. In einer ersten Amplifikation wurde die Reaktion mit einem genspezifischen Primer und dem RACE-Long Primer durchgeführt. In einer zweiten Amplifikation wurde das Produkt der ersten Reaktion als Matrize eingesetzt. Hierbei wurde der RACE-Short Primer und ein weiterer, ebenfalls innerhalb der bereits amplifizierten Sequenz gelegener, genspezifischer Primer verwendet. Durch dieses auch nested-PCR genannte Verfahren lässt sich die Spezifität der Methode deutlich erhöhen.

3.6.2 RT-PCR

Die RT-PCR stellt eine Kombination zweier Verfahren dar. Zunächst wird eine reverse Transkription durchgeführt [V.3.5] und anschließend eine Polymerasekettenreaktion [V.3.6]. Die RT-PCR wurde ausschließlich mit genspezifischen Primern durchgeführt. Sie wurde eingesetzt, um die Transkription verschiedener Gene in untersuchten RNA-Präparationen zu beurteilen. Die RT-PCR ist im Gegensatz zur real time RT-PCR ein semi-quantitatives Verfahren.

3.7 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe der Gelelektrophorese in einer Agarosematrix auftrennen. Diese Gele weisen eine Agarosekonzentration zwischen 1-2 % auf. Geringe Konzentrationen eignen sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten der Größe 100–10.000 bp. Höhere Konzentrationen dienen der Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente. Ethidiumbromid interkaliert in DNA und kann bei 302 nm im UV-Licht detektiert werden. Agarosekonzentration und angelegte Spannung bedingen die Trennschärfe der Elektrophorese.

Gele wurden durch Aufkochen der Agarose in TAE-Puffer und Zugabe von Ethidiumbromid hergestellt und auf Trägerschlitten mit Taschenkämmen ausgekühlt. DNA-Proben wurden zur Erhöhung der Dichte mit 6x Ladepuffer gemischt und parallel zu einem DNA-Größenmarker elektrophoretisch bei 110 V aufgetrennt.

3.7.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente lassen sich durch Elektrophorese auf Agarosegelen nach ihrer Größe auftrennen. Um mit den aufgetrennten Fragmenten weiterarbeiten zu können, müssen diese aus der Matrix extrahiert werden.

Dazu wurden unter UV-Licht die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits zurück gewonnen. Das Verfahren beruht auf der Schmelze des Gels in Extraktionspuffer, Adsorption der DNA an einer Kieselgelmatrix und abschließenden Wasch- und Elutionsschritten. Die so extrahierte DNA kann direkt für weitere Arbeitsschritte eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

3.8 Restriktion mit Typ II-Endonuklease

Restriktionsenzyme lassen sich in drei Klassen einteilen. Typ I und Typ III klassifizierte Enzyme sind ATP-abhängig, besitzen Endonuklease- und Methylaseaktivität und schneiden DNA in unterschiedlicher Entfernung zur Erkennungssequenz. Es entstehen DNA Fragmente definierter Länge mit variablen Enden. Die hier verwendeten Typ II Endonukleasen sind nicht ATP-abhängige Enzyme, die Phosphodiesterbindungen der DNA an meist palindromischen Erkennungssequenzen hydrolysieren.

Für den Restriktionsverdau wurde das entsprechende Enzym nach Angaben des Herstellers mit Puffer und DNA versetzt und für 60 min inkubiert [Tabelle V-7]. Wurden zwei Endonukleasen gleichzeitig eingesetzt, so wurde ein entsprechender Puffer für ausreichende Enzymaktivitäten ausgewählt.

Tabelle V-7: Standard-Restriktionsansatz

Komponente	Volumen
DNA [50-200 ng/µl]	3 µl
Endonuklease	0,5 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
dH ₂ O	14,5 µl

3.8.1 Restriktionsverdau für DNA-Fingerprints

DNA-Fragmente verschiedener Gene lassen sich mit Hilfe eines Restriktionsverdaus mit Typ II-Endonukleasen voneinander unterscheiden (Cukovic et al., 2001). Anhand von Nukleotidsequenzvergleichen bekannter Fragmente können Enzyme ausgewählt werden, die jedes einzelne Fragment unterschiedlich hydrolysieren. Dabei muss für ein bekanntes cDNA-Fragment ein eindeutiges Restriktionsmuster zu erwarten sein. Nach Restriktionsverdau unbekannter cDNA-Fragmente werden die erhaltenen Restriktionsfragmente elektrophoretisch getrennt und mit dem Restriktionsmuster bekannter cDNA-Fragmente verglichen.

In dieser Arbeit wurden cDNA-Fragmente mit degenerierten Primern amplifiziert, in einen T-Überhangvektor kloniert und aus individuellen Kolonien Plasmid-DNA isoliert [V.3.11]. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde jeweils durch drei unterschiedliche Endonukleasen verdaut und die erhaltenen Restriktionsmuster bewertet. Plasmid-DNA, die unerwartete Restriktionsmuster generierte, wurde sequenziert [V.3.14].

3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Linearisierte Plasmidvektoren können mit Hilfe von T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente aufnehmen. Dabei kann man zwischen der Klonierung mit klebrigen Enden (sticky ends) und der Klonierung mit glatten Enden (blunt ends) unterscheiden. Klonierungen in die hier verwendeten Vektoren [IV.1.3.2] erfolgten ausschließlich über sticky ends. Die Ligationen wurden bei 10 °C für 12-16 h durchgeführt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug dabei 3:1 bis 10:1.

Ein Beispiel eines Ligationsansatzes zeigt Tabelle V-8.

Tabelle V-8: Ligationsansatz

Komponente	Volumen
Vektor-DNA [50 ng/μl]	1 μl
Insert-DNA [50 ng/μl]	3 μl
10x Reaktionspuffer	1 μl
T4-DNA-Ligase [5 units/μl]	0,5 μl
dH ₂ O	ad 10 μl

3.9.1 Klonierung in das pGEM-T Easy Vektor System

Aus der PCR gewonnene DNA-Amplifikate können bei Verwendung von *Taq*-Polymerase direkt in einen T-Überhangvektor kloniert werden. Dabei macht man sich die Eigenschaft der Polymerase zu Nutze, die DNA-Synthese stets mit einem Überhang eines Desoxyadenosins abzuschließen. Dieser Überhang dient zur Klonierung in den komplementären Desoxythymidin-Überhangvektor, wobei die Insertionsrichtung nicht vorgegeben ist. Der pGEM-T Easy Vektor stellt ein high-copy Plasmid dar, welches benachbart der Multiple-Cloning-Site (MCS) T7- und SP6-RNA-Polymerasepromotoren besitzt. Die MCS ist ihrerseits in die *lacZ*-Kassette integriert, so dass erfolgreich eingefügte Inserts auf entsprechendem Medium mit X-Gal und IPTG durch Blau-/ Weißselektion identifiziert werden können. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen.

Mit pGEM-T Easy erstellte Vektorkonstrukte wurden für die Fragmentanalyse mittels Restriktionsverdau oder Sequenzierung verwendet.

3.9.2 Klonierung in das pRSET B Vektor System

Wurden offene Leserahmen für die heterologe Expression von Proteinen in das pRSET B Vektor-System ligiert, so wurden bereits die PCR-Primer mit den benötigten Restriktionsschnittstellen versehen [V.3.3.1]. Daraus gewonnene DNA-Amplifikate und der Expressionsvektor wurden mit den entsprechenden Endonukleasen verdaut und die daraus resultierenden komplementären Überhänge mittels T4-DNA-Ligase verknüpft. Durch den Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsschnittstellen innerhalb der MCS war eine gerichtete Insertion möglich, so dass eine dem Leseraster folgende Transkription gewährleistet werden konnte.

Der pRSET B Vektor verfügt zwischen dem T7-Promotor und der MSC über einen Bereich, der für Polyhistidin (6x His) kodiert. Dieser wird bei der Expression N-terminal an das rekombinante Protein angefügt und dient der späteren Aufreinigung [V.2.5]. Der pRSET B Plasmidvektor trägt ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen.

3.10 Transformation von *E. coli*

Für den Transfer von Vektorkonstrukten in kompetente Zellen wurden die unter [IV.1.3] angegebenen *E. coli*-Stämme verwendet.

3.10.1 Transfer von Plasmid-DNA in DH5 α

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese in kompetente *E. coli*-Zellen [V.3.2] vom Stamm DH5 α mittels Hitzeschock transferiert. 50 μ l der kompetenten *E. coli*-Zellen wurden mit 1-5 μ l Plasmid-DNA aus der Ligation versetzt und nach 20 min Inkubation auf Eis in einem Wasserbad für 45 sec auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock). Es wurde anschließend auf Eis für 2 min gekühlt und der Ansatz mit 950 μ l SOC-Medium gemischt. Nach einer Inkubation von 90 min bei 37 °C auf einem Schüttler wurden die Bakterien abzentrifugiert, in ca. 200 μ l SOC-Medium aufgenommen und auf Selektionsmedium ausgestrichen. Erfolgreich transformierte Bakterien konnten nach Inkubation über Nacht (37 °C) detektiert werden.

3.10.2 Transfer von Plasmid-DNA in BL21(DE3)pLysS

Der Transfer von Plasmid-DNA in BL21(DE3)pLysS wurde analog [V.3.10.1] mit dem Hitzeschockverfahren durchgeführt. Der hier verwendete *E. coli*-Stamm wurde für die heterologe Expression rekombinanter Proteine eingesetzt.

BL21(DE)pLysS zeichnet sich durch eine zusätzliche Expression von T7 Lysozym aus. T7 Lysozym führt erstens zu einer Unterdrückung der basalen Expression des rekombinanten Proteins und zweitens zur Spaltung von Peptidoglycanbindungen in der Bakterienzellwand, wodurch die spätere Ultraschall-Lyse [V.2.4] der Bakterien erleichtert wird. BL21(DE3)pLysS trägt für erweiterte Selektionsmöglichkeiten eine Chloramphenicol-Resistenz.

3.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde in *E. coli*-Zellen vom Stamm DH5 α über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler vermehrt und nach Methode der alkalischen Lyse (Bimboim und Doly, 1979) isoliert. Die Ausbeuten dieses Verfahrens lagen bei 100-500 ng/ μ l.

Zur Durchführung der Methode wurden 2 ml der Übernachtskultur zentrifugiert und das Bakterienpellet in Puffer 1 [IV.6.5] resuspendiert. Durch Zugabe von Puffer 2 wurde die alkalische Lyse mit SDS eingeleitet. RNase A baute störende RNA während der 5 min Inkubation bei Raumtemperatur ab. Durch Zugabe von Puffer 3 wurden zelluläre Bestandteile und Proteine während einer Inkubation für 20 min auf Eis gefällt. Der abzentrifugierte Überstand wurde zweimal mit Chloroform gewaschen und die Plasmid-DNA mit 2-Propanol 100% aus der wässrigen Phase präzipitiert. Das nach 30 min Zentrifugation sedimentierte Pellet wurde in Ethanol 70% gewaschen, anschließend bei 37 °C getrocknet und in 30 μ l TE-Puffer aufgenommen.

3.11.1 Insertionskontrolle

Insertionskontrolle von Plasmiden dient der Überprüfung auf erfolgreiche Ligation und Transformation. Erfolgreiche Transformation wird im Allgemeinen durch eine vermittelte Antibiotika-Resistenz im Vektorkonstrukt überprüft. Transformierte kompetente *E. coli*-Zellen können sich so auf Selektionsmedium vermehren. Eine erfolgreiche Insertion von DNA-Fragmenten in den Vektor lässt sich z.B. durch Blau-/ Weißselektion kontrollieren. Dabei wird das *lacZ*-Gen des Vektors durch das

Insert unterbrochen und eine Komplementierung der β -Galactosidase verhindert. Dieses führt auf Medium mit IPTG und X-Gal zur Bildung von weißen Kolonien, gegenüber blauen Kolonien bei intakter β -Galactosidase.

Die erfolgreiche Ligation des Zielfragments wurde nach Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen überprüft. Dafür wurden jeweils das Insert flankierende Schnittstellen des Vektors verwendet und die Größe der Restriktionsfragmente mittels Elektrophorese [V.3.7] überprüft.

3.12 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer Absorption von UV-Licht photometrisch quantifiziert werden. Die Bestimmung der Konzentration [c] über die Absorption A erfolgte bei $\lambda = 260$ nm (Sambrook und MacCallum, 2001).

$$[c] = A * \epsilon_{260} * \text{Verdünnung} \qquad \epsilon = \text{Extinktionskoeffizient}$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ für $\lambda = 260$ nm beträgt:

$$\text{ssDNA} \qquad = 1,0 A \sim 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$\text{dsDNA und RNA} \qquad = 1,0 A \sim 33 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$\text{Oligonukleotide} \qquad = 1,0 A \sim 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Darüber hinaus lässt sich durch Bildung des Verhältnisses der Extinktionen bei $\lambda = 260$ nm / $\lambda = 280$ nm die Reinheit von DNA-Präparationen abschätzen. Der Quotient sollte einen Wert zwischen 1,8–2,0 aufweisen. Geringere Werte deuten auf Verunreinigungen durch z.B. Proteine hin, die bei $\lambda = 280$ nm absorbieren.

3.13 Heterologe Expression rekombinanter Proteine

Größere Mengen rekombinanten Proteins lassen sich über die heterologe Expression in *E. coli* herstellen. Das unter [V.3.9.2] vorgestellte Vektorkonstrukt wurde dazu in BL21(DE3)pLysS transferiert und die transformierten Zellen auf TB-Medium unter Antibiotika-Selektion kultiviert. Aus einer 5 ml Übernachtskultur wurden 800 μl in 50 ml frisches TB-Medium ohne Antibiotika-Zusatz inokuliert und bis zu einer OD_{600} 0,6–0,8 herangezogen. Die Expression der T7-RNA-Polymerase und damit gleichzeitig die des rekombinanten Proteins wurden durch Zugabe von 20 μl IPTG [100 mM] induziert. Die Expression dauerte bei 22 °C und einer Rotation von

125 rpm über Nacht an. Heterolog exprimiertes Protein wurde aus den Bakterien durch Ultraschall-Lyse freigesetzt [V.2.4].

3.14 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde der ABI PRISM 377 von Applied Biosystems eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Dabei wird zunächst eine PCR mit genspezifischen Primern mit Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt. Zusätzlich zu dNTPs werden dem Reaktionsansatz Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt. Aufgrund der fehlenden Verknüpfungsstelle in 3'-Position der Didesoxyribose kommt es bei Einbau eines ddNTPs während der Elongation zum Kettenabbruch. Es werden während der PCR so alle denkbaren Längen der Matrizen-DNA bis zum jeweiligen Abbruch synthetisiert. Die ddNTPs tragen für jedes der vier möglichen Nukleotide jeweils individuelle Fluoreszenzfarbstoffe. Die so entstandenen, unterschiedlich langen ssDNA-Fragmente werden auf einer Polyacrylamidmatrix elektrophoretisch getrennt und das terminale, fluoreszenzmarkierte Nukleotid mittels Laserlichtanregung detektiert.

3.14.1 Probenvorbereitung

Die PCR wurde mit dem BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Als Matrize diente 1 µg Plasmid-DNA [V.3.11]. Folgendes Reaktionsgemisch wurde verwendet [Tabelle V-9]:

Tabelle V-9: Ansatz zur DNA-Sequenzierung

Komponente	Volumen
BigDye [®] Terminator	0,5 µl
Plasmid-DNA [1 µg/µl]	1 µl
Primer [10 pmol/µl]	1 µl
dH ₂ O	7,5 µl

Die PCR wurde gemäß Tabelle V-10 durchgeführt.

Tabelle V-10: PCR-Programm zur DNA-Sequenzierung

Schritt	Temp. [°C]	Zeit [sec]	Zyklen zu Schritt	Beschreibung
1	96	60		Denaturierung
2	96	30		Denaturierung
3	50	15		Anlagerung
4	60	240	25 x zu Schritt 2	Elongation
5	8	(pause)		Stopp

Die Kettenabbruchfragmente wurden nach der PCR durch Ethanolfällung aus einer 0,3 M Natriumacetatlösung von den übrigen Reaktionskomponenten getrennt. Die durch Zentrifugation sedimentierte DNA wurde mit Ethanol 70% gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurde die DNA in Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert.

3.14.2 PAGE für die DNA-Sequenzierung

Das Polyacrylamidgel für die DNA-Sequenzierung wies eine Stärke von 0,2 mm auf und bestand aus folgenden Komponenten [Tabelle V-11]:

Tabelle V-11: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen zur DNA-Sequenzierung

Komponente	Masse, Volumen
Harnstoff	9 g
10x TBE-Puffer	3 ml
ddH ₂ O	11,5 ml
Acrylamid/Bis. 30%	3,75 ml
TEMED	10 µl
10% (w/v) APS	200 µl

Die durch APS gestartete und durch TEMED katalysierte Polymerisation des Acrylamids war nach 90 min abgeschlossen. Das fertige Gel wurde mit den Proben beladen und im ABI PRISM 377 entwickelt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über die FacturaTM-Software (Perkin Elmer).

3.15 Computergestützte Auswertung von DNA-Daten

DNA-Sequenzen und daraus abgeleitete Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe der Software EditSeq, MegAlign, SeqMan und MapDraw von DNASTAR analysiert.

Für einen Datenbankvergleich mit bekannten DNA- und Aminosäuresequenzen wurde das Internetportal des NCBI mit der enthaltenen BLAST Suchoption (Altschul et al., 1997) verwendet.

4 Methoden der Synthese

4.1 Darstellung von 3,4,5-Trimethoxybiphenyl

Das 3,4,5-Trimethoxybiphenyl wurde über eine Suzuki-Kupplung mit Hilfe eines Palladium-Katalysators synthetisiert. Die Reaktion beruht auf einer oxidativen Addition eines Organohalogenids an den Katalysator, der dabei von der Oxidationsstufe (0) in die Oxidationsstufe (II) übergeht. In einem zweiten Schritt wird durch Transmetallierung ein Organometall angelagert. Abschließend erfolgt unter Regeneration des Palladium-Katalysators zur Oxidationsstufe (0) die Ausbildung einer neuen C-C-Verknüpfung, welche reaktiv aus dem Katalysatorkomplex eliminiert wird [Abbildung 48].

Als Organohalogenid wurden 10 mmol 5-Bromo-1,2,3-trimethoxybenzol eingesetzt. In einem Dreihalskolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 75 ml Toluol vorgelegt. Darin wurden 720 mg des Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium(0)-Katalysators zusammen mit dem Organohalogenid gelöst. Es wurden 15 ml einer wässrigen 2 M Natriumcarbonatlösung hinzugefügt und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Mischung wurden 11 mmol Phenylboronsäure in 40 ml Ethanol zugetropft. Die Reaktion wurde für 2 h unter Rühren auf 80 °C zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde überschüssige Boronsäure mit 3 ml 30% Wasserstoffperoxidlösung zersetzt und die Mischung für 1 h gerührt. Es wurde mit 30 ml 2 M Natronlauge alkalisiert und die Reaktionsprodukte mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.

Das gewünschte 3,4,5-Trimethoxybiphenyl wurde aus dem Reaktionsgemisch mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Ethylacetat:n-Pentan (1:1) isoliert.

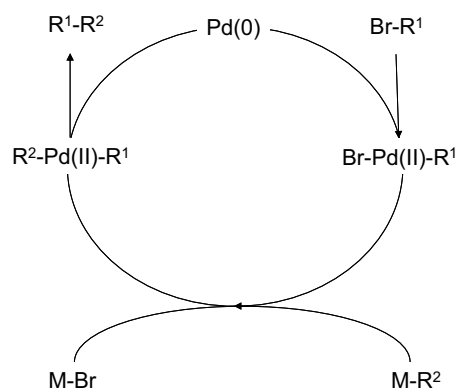
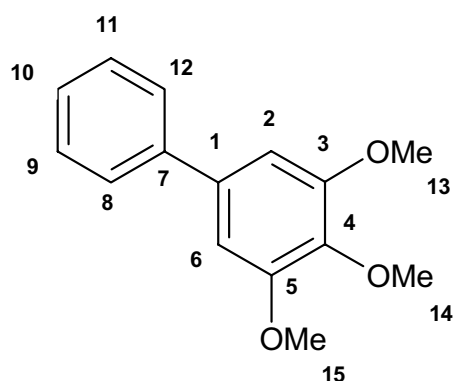


Abbildung 48: Mechanismus der Suzuki-Kupplung (Miyaura et al., 1981)

Summenformel: C₁₅H₁₆O₃

Molare Masse: 244,29 g/mol



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ=7.55 (m, 2H, H₈/H₁₂), 7.44 (m, 2H, H₉/H₁₁), 7.34 (m, 1H, H₁₀), 6.78 (s, 2H, H₂/H₆), 3.92 (s, 6H, H₁₃/H₁₅), 3.90 (s, 3H, H₁₄);
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ=153.4 (C₃/C₅), 141.4 (C₄), 137.6 (C₁), 137.2 (C₇), 128.7 (C₉/C₁₁), 127.4 (C₈/C₁₂), 127.1 (C₁₀), 104.5 (C₂/C₆), 60.9 (C₁₄), 56.2 (C₁₃/C₁₅);
¹³C-NMR DEPT (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ=128.7 (C₉/C₁₁), 127.4 (C₈/C₁₂), 127.1 (C₁₀), 104.5 (C₂/C₆), 60.9 (C₁₄), 56.2 (C₁₃/C₁₅);
 MS (70 eV): *m/z* (%): 244 (100, [M]⁺), 229 (70), 214 (2), 201 (21), 186 (9), 171 (9), 152 (3), 141 (8), 127 (4), 115 (20)

4.2 Abspaltung von O-Methylschutzgruppen

Das unter [V.4.1] erhaltene 3,4,5-Trimethoxybiphenyl wurde mit Hilfe von Bortribromid (BBr_3) der Etherspaltung unterworfen. Dabei kommt es durch Zugabe der Lewisäure Bortribromid und abschließender Hydrolyse zur Bildung der Alkohole [Abbildung 49].

Es wurden 3 Moläquivalente BBr_3 in Dichlormethan unter Rühren gelöst und diese Mischung mit Trockeneis auf $-80\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Das ebenfalls in Dichlormethan gelöste 3,4,5-Trimethoxybiphenyl (1 Moläquivalent) wurde unter Rühren hinzugesetzt. Anschließend wurden langsam 75 ml H_2O dazu getropft und die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt. Die organische Phase wurde mit 30 ml einer wässrigen 1 M Natriumthiosulfatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde nochmals mit H_2O gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

3,4,5-Trihydroxybiphenyl wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Ethylacetat:n-Pentan (1:1) gewonnen.

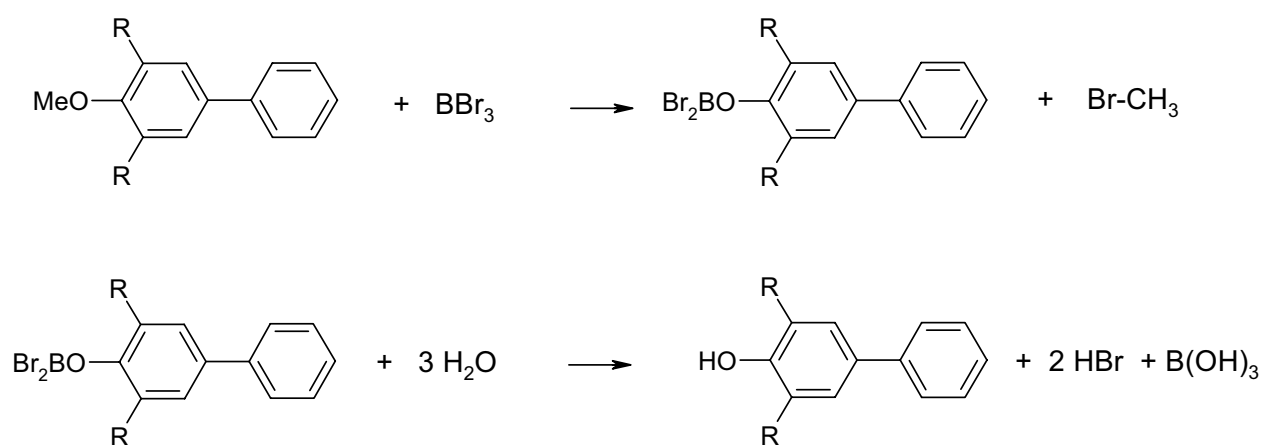
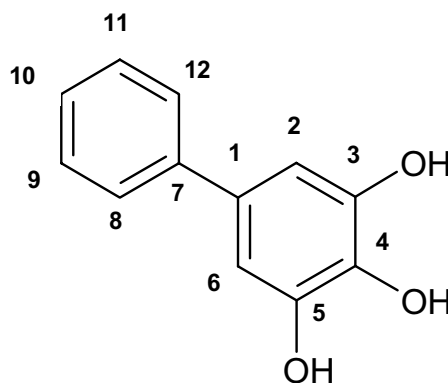


Abbildung 49: Mechanismus der Schutzgruppenabspaltung nach McOmie et al. (1968)

Summenformel: C₁₂H₁₀O₃

Molare Masse: 202,21 g/mol

M (3-fach silyliert): 418,20 g/mol



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ= 7.49 (m, 2H, H8/H12), 7.39 (m, 2H, H9/H11), 7.31 (m, 1H, H10), 6.74 (s, 2H, H2/H6), 5.33 (s, 3H, OH); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, ppm): δ= 144.1 (C3/C5), 140.5 (C7), 133.8 (C1), 131.2 (C4), 128.7 (C9/C11), 127.0 (C10), 126.7 (C8/C12), 108.1 (C2/C6); ¹³C-NMR DEPT (150 MHz, CDCl₃, ppm): δ= 128.7 (C9/C11), 127.0 (C10), 126.7 (C8/C12), 108.1 (C2/C6); MS (MSTFA) (70 eV): *m/z* (%): 418 (100, [M]⁺), 403 (7), 330 (6), 315 (53), 278 (20), 269 (3), 195 (3), 147 (5), 133 (6), 73 (42)

4.3 Methylierung von 3,4,5-Trihydroxybiphenyl

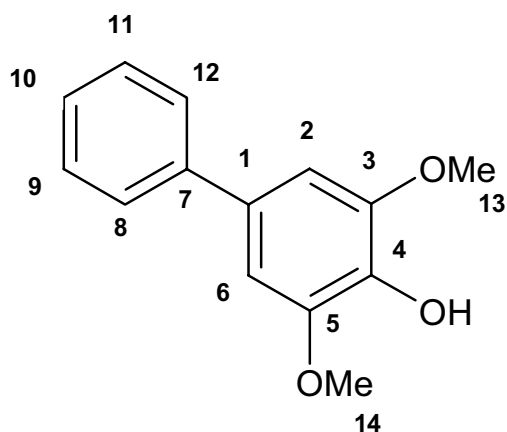
Das unter [V.4.2] gewonnene Produkt wurde mittels Dimethylsulfat an den freien Hydroxyfunktionen methyliert. Die Methylgruppen des Dimethylsulfats stellen gute Abgangsgruppen dar, mit deren Hilfe sich azide Hydroxyfunktionen methylieren lassen.

Die Reaktion wurde abgewandelt nach Saljoughian et al. (1990) durchgeführt. Das 3,4,5-Trihydroxybiphenyl (250 mg) wurde in 25 ml 13 mM Natronlauge gelöst und unter Rühren in einem Eisbad gekühlt. Es wurden 15 Moläquivalente Dimethylsulfat zugetropft und die Mischung weiter bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von 10% Salzsäure gestoppt und die wässrige Lösung zweimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Trennung des Produktgemisches erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Ethylacetat:n-Pentan (1:9). Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels GC-MS [V.5.2] untersucht. Gereinigtes Aucuparin wurde zusätzlich mittels IR- und UV-Spektroskopie analysiert und mittels NMR aufgeklärt.

Summenformel: C₁₄H₁₄O₃

Molare Masse: 230, 10 g/mol

Retentionsindex (ZB-5ms): 2094



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ= 8.46 (s, 1H, OH), 7.54 (m, 2H, H8/H12), 7.43 (m, 2H, H9/ H11), 7.32 (m, 1H, H10), 6.80 (s, 2H, H2/H6), 3.96 (s, 6H, H13/H14);
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ= 147.3 (C3/C5), 141.5 (C7), 134.4 (C1), 132.9 (C4), 128.7 (C9/C11), 126.945 (C10), 126.937 (C8/C12), 104.1 (C2/C6), 56.4 (C13/C14);
¹³C-NMR DEPT (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ= 128.7 (C9/C11), 126.945 (C10), 126.937 (C8/C12), 104.1 (C2/C6), 56.4 (C13/C14); MS (70 eV):
m/z (%): 230 (100, [M]⁺), 215 (44), 187 (50), 172 (17), 169 (8), 155 (5), 144 (8), 141 (8), 127 (8), 115 (18); IR (Diamant-ATR, cm⁻¹): 3507 (O-H), 3443, 3002 (C-H), 2936, 2841 (O-CH₃), 1611, 1575, 1521, 1342, 1110, 763; UV (λ_{max}, nm, 50% MeOH): 225, 275

5 Instrumentelle Analytik

5.1 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie dient der Auftrennung von Substanzgemischen im μg -ng Maßstab. Die Trennung erfolgt an einer stationären Phase durch Adsorptionsvorgänge. Eine flüssige mobile Phase eluiert die Analyten von der Trennsäule in Abhängigkeit von der Elutionskraft der mobilen Phase einerseits und der Stärke der Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase andererseits.

Für die durchgeführten Chromatographien wurden als stationäre Phase ausschließlich eine C_{18} -Umkehrphasen verwendet. Als Eluenten wurden Methanol und bidestilliertes Wasser (0,1% v/v H_3PO_4) in Gradientenprogrammen eingesetzt. Die Detektion der Analyten erfolgte mittels online UV-Spektroskopie.

5.1.1 Instrumentierung

<i>Pumpe</i>	Waters 1525 Binary HPLC Pump
<i>Detektion</i>	Waters 2487 Dual Wavelength Detector
<i>Säule</i>	Phenomenex Hyper Clone ODS (C_{18}), 5μ , $150 \times 4,6$ mm
<i>Software</i>	Waters Breeze ver. 3.20

5.1.2 Gradientenprogramme

Für die HPLC-Analyse wurden folgende Gradientenprogramme genutzt [Tabelle V-12]. Die Flussrate betrug jeweils 0,5 ml/min.

Tabelle V-12: HPLC-Gradientenprogramme

Analyt	Zeit [min]	MeOH [%]	Detektion [nm]
3-HBS	0	30	254, 295
	2	30	
	14	70	
	20	70	
	25	100	
	30	100	
	31	30	
	35	30	
Xanthone	0	50	254, 306
	2	50	
	30	90	
	35	90	
	36	100	
	41	100	
	42	50	
	45	50	

5.2 Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS)

Gaschromatographische Trennungen von Substanzgemischen können im Gegensatz zur HPLC gut für flüchtige Verbindungen durchgeführt werden. Klassische GC-Säulen sind mit Festphasen versehen und es findet eine Adsorptionschromatographie statt. Moderne Systeme sind mit flüssigkeitsbeschichteten Kapillaren ausgestattet, an deren Oberfläche eine Verteilungschromatographie zwischen der Gas- und Flüssigphase erfolgt.

Als stationäre Phase diente eine modifizierte Dimethylpolysiloxan beschichtete Quarzkapillare. Als mobile Phase wurde das Trägergas Helium verwendet. Hydrophile, schwer flüchtige Verbindungen wurden zur Silylierung mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (MSTFA) umgesetzt und so der GC-Analytik zugänglich gemacht. Dazu wurde die Substanz in MSTFA (0,2 mg/ml) gelöst und für 30 min bei 70 °C erwärmt. So wurde die vollständige Umsetzung der Hydroxyfunktionen an Biphenylderivaten durchgeführt.

Die Berechnung von Retentionsindices wurde über eine Alkanreihe im Bereich von C₁₁-C₂₈ realisiert.

Die Detektion erfolgte massenspektrometrisch.

5.2.1 Instrumentierung

<i>Gaschromatograph</i>	Agilent 6890
<i>Säule</i>	Phenomenex ZB-5ms
<i>Split</i>	1:10, 250 °C
<i>Transferline</i>	250 °C
<i>Trägergasstrom</i>	Helium, 1 ml/min
<i>Massenspektrometer</i>	JEOL JMS-T100GC, GCAccuTOF
<i>Ionisation</i>	70 eV
<i>Auflösung</i>	<i>m/z</i> 41.0-600.0
<i>Aufnahmeintervall</i>	0,4 sec
<i>Software</i>	JOEL MassCenter™

5.2.2 Temperaturprogramm

Für die GC-MS Analyse der Produkte und Zwischenstufen der Aucuparinsynthese wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet [Tabelle V-13].

Tabelle V-13: Temperaturprogramm für GC-MS

Analyt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Biphenyle	50	3	Split- Injektion
	+ 10 /min	26	
	310	3	Stopp

5.3 Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie (MS/MS)

Das enzymatisch gebildete Produkt der Sa4CL2-Reaktion mit dem Substrat *p*-Cumarsäure wurde über Festphasenextraktion [V.2.6.2] gereinigt und mittels ESI MS/MS analysiert und charakterisiert. Die Lösung wurde über eine Spritzenpumpe (5-10 μ l/min) in das Massenspektrometer infundiert. Die MS-Analysen wurden im Q1+ (positiver Full-Scan Modus) und die MS/MS-Experimente im EPI+ (enhanced product ion scan, positiver Modus) aufgenommen. Die ESI-MS Einstellungen wurden auf das zu erwartende Molekülion $[M+H]^+$ bzw. auf die Fragmentionenspektren hin optimiert [Tabelle V-14].

5.3.1 Instrumentierung

<i>Massenspektrometer</i>	Applied Biosystems 3200 Q TRAP, Turbo V Ion Source
<i>Software</i>	Analyst 1.4.2
<i>Collision gas</i>	N ₂

Tabelle V-14: MS/MS-Parameter

Parameter / Experiment	Q1 +	EPI +
Curtain gas	10 ml/min	10 ml/min
Collision gas	-	medium
Ionenspray-Spannung	5500 V	5500 V
Heizung	-	-
Ion source gas 1	10 ml/min	10 ml/min
Ion source gas 2	-	-
Declustering potential	61 V	73 V
Entrance potential	11 V	12 V
Collision energy	-	39 V
Collision cell exit potential	-	4 V

5.4 Kernresonanzspektrometrie (NMR)

Syntheseprodukte und Zwischenstufen aus der Aucuparinsynthese wurden mittels Kernresonanzspektrometrie identifiziert. Dazu wurden Teilmengen der isolierten Verbindungen zunächst mittels GC-MS [V.5.2] auf Reinheit überprüft. Daraufhin wurden die Substanzen in deuteriertem Chloroform gelöst und NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messungen für ^1H -NMR erfolgten bei 400 MHz.

Zur weitergehenden Strukturaufklärung wurden darüber hinaus ^{13}C und ^{13}C -DEPT-NMR-Verfahren bei 100 MHz und 150 MHz eingesetzt.

VI. Zusammenfassung

- Benzoessäure und Benzoessäurederivate können in Pflanzen über vielfältige Biosynthesewege gebildet werden. Es sind unterschiedlichste Mechanismen für verschiedene Pflanzen beschrieben worden. Eine Aufklärung von beteiligten Enzymen sowie die damit verbundene Darstellung der Reaktionsabfolge der einzelnen Biosynthesewege ist bisher nur begrenzt gelungen. Mit Zellkulturen von *Centaureum erythraea* steht ein interessantes Modellsystem zur Untersuchung der Biosynthese von 3-Hydroxybenzoessäure über Zwischenstufen des Shikimatweges zur Verfügung.
- In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals in biochemischen Untersuchungen die ATP-abhängige Biosynthese der 3-Hydroxybenzoessäure aus Shikimisäure gezeigt werden. Das enzymatische Produkt wurde ausschließlich in Elicitor-behandelten Zellkulturen von *C. erythraea* nachgewiesen, die neben dem konstitutiv gebildeten 1-Hydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxyxanthon auch das 1-Hydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyxanthon akkumulieren.
- Untersuchungen zur Biosynthese der Benzoessäure wurden ebenfalls durchgeführt, wobei *p*-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL) in Zellkulturen von *Sorbus aucuparia* bearbeitet wurden. Die 4CL wird in höheren Pflanzen von Genfamilien kodiert. Eine Spezialisierung der einzelnen Isoformen liegt aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten, Expressionsmuster und struktureller Organisation ihrer Gene nahe. 4CL-Isoformen lassen sich bei einigen Pflanzen so der Lignin-Biosynthese oder anderen Phenylpropan-Wegen zuordnen. Trotz unterschiedlicher Substratspezifitäten beschränkt sich das Aktivitätsspektrum aller bekannten 4CLs auf Zimtsäurederivate.

- Hier konnte mit *Sa4CL2* die zweite *p*-Cumarat:CoA-Ligase aus *S. aucuparia* identifiziert werden. Der ORF umfasst 1644 bp und kodiert für 547 Aminosäuren. *Sa4CL2* hat eine Molekülmasse von ca. 62 kDa. Die höchste katalytische Effizienz (K_{cat}/K_M) zeigt sich gegenüber Ferulasäure und Kaffeesäure, gefolgt von *p*-Cumarsäure und Zimtsäure. Sinapinsäure und Benzoessäure werden nicht akzeptiert. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei pH 7,5 und das Temperaturoptimum bei 35-40 °C. Die Reaktion ist abhängig von divalenten Kationen, wobei mit Mangan und Magnesium die höchsten Aktivitäten erzielt werden.
- Für die drei bisher bekannten *Sa4CL*-Isoformen wurde hier eine differenzielle Expression in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen. *Sa4CL2* und *Sa4CL3* weisen daneben unterschiedliche Substratspezifitäten auf. Zusammen mit signifikanten Unterschieden in der Primärstruktur der Proteine können *Sa4CL1* und *Sa4CL2* der Klasse I der 4CLs (Lignin-Biosynthese) und *Sa4CL3* der Klasse II (Flavonoid-Biosynthese) zugeordnet werden.
- Eine massive Steigerung der 4CL-Expression in Elicitor-behandelten Zellkulturen von *S. aucuparia* findet im Gegensatz zur starken Induktion der Biphenyl-Synthase nicht statt. *Sa4CLs* scheinen folglich weder an der Biosynthese noch der Aktivierung von Benzoessäure beteiligt zu sein. Eine klassische Rekrutierung der 4CLs für die Lignin-Biosynthese und andere Phenylpropan-Stoffwechselwege liegt nahe.
- *S. aucuparia* bildet nach Pathogenbefall Phytoalexine vom Biphenyl-Typ. Das mengenmäßig häufigste Biphenyl ist das Aucuparin. In dieser Arbeit wurde ein Syntheschema erarbeitet, das neben Aucuparin auch die isomeren Dihydroxy-monomethoxybiphenyle und das isomere Monohydroxy-dimethoxybiphenyl zugänglich macht. Ausgehend von einer Suzuki-Kupplung sind so auch mögliche Zwischenprodukte der Aucuparin-Biosynthese leicht darstellbar. Diese können als Substrate für die Untersuchung von *O*-Methyltransferase-Reaktionen wertvoll sein.

VII. Literatur

- Abd El-Mawla AM, Beerhues L;** Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta* **214**: 727-733 (2002)
- Abd El-Mawla AM, Schmidt W, Beerhues L;** Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN. *Planta* **212**: 288-293 (2001)
- Abou Shoer M, Boettner FE, Chang CJ, Cassady JM;** Antitumour and cytotoxic xanthenes of *Psorospermum febrifugum*. *Phytochemistry* **27**: 2795-2800 (1988)
- Achterholt S, Priefert H, Steinbüchel A;** Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 799-807 (2000)
- Allina SM, Pri-Hadash A, Theilmann DA, Ellis BE, Douglas CJ;** 4-Coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. *Plant Physiol* **116**: 743-754 (1998)
- Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D;** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402 (1997)
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N;** Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* **130**: 2243-2250 (2000)
- Auburger G, Winter J;** Purification and characterization of benzoyl-CoA ligase from a syntrophic, benzoate-degrading, anaerobic mixed culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 789-795 (1992)
- Bacles CF, Lowe AJ, Ennos RA;** Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. *Mol Ecol* **13**: 573-584 (2004)
- Bains J, Boulanger MJ;** Biochemical and structural characterization of the paralogous benzoate:CoA ligases from *Burkholderia xenovorans* LB400: defining the entry point into the novel benzoate oxidation (box) pathway. *J Mol Biol* **373**: 965-977 (2007)
- Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, Kundu TK;** Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J Biol Chem* **279**: 33716-33726 (2004)

- Barillas W, Beerhues L;** 3-Hydroxybenzoate:coenzyme A ligase and 4-coumarate:coenzyme A ligase from cultured cells of *Centaureum erythraea*. *Planta* **202**: 112-116 (1997)
- Baucher M, Monties B, Montagu MV, Boerjan W;** Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev Plant Sci* **17**: 125-197 (1998)
- Becker-Andre M, Schulze-Lefert P, Hahlbrock K;** 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 (1991)
- Beerhues L;** Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaureum erythraea*. *FEBS Letters* **383**: 264-266 (1996)
- Beerhues L, Berger U;** Differential accumulation of xanthenes in methyl-jasmonate- and yeast-extract-treated cell cultures of *Centaureum erythraea* and *Centaureum littorale*. *Planta* **197**: 608-612 (1995)
- Beuerle T, Pichersky E;** Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme a esters. *Anal Biochem* **302**: 305-312 (2002)
- Beuerle T, Pichersky E;** Purification and characterization of benzoate:coenzyme A ligase from *Clarkia breweri*. *Arch Biochem Biophys* **400**: 258-264 (2002)
- Bimboim HC, Doly J;** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523 (1979)
- Boatright J, Negre F, Chen X, Kish CM, Wood B, Peel G, Orlova I, Gang D, Rhodes D, Dudareva N;** Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol* **135**: 1993-2011 (2004)
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M;** Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 519-546 (2003)
- Borejsza-Wysocki W, Lester C, Attygalle AB, Hrazdina G;** Elicited cell suspension cultures of apple (*Malus x domestica*) cv. Liberty produce biphenyl phytoalexins. *Phytochemistry* **50**: 231-235 (1999)
- Bradford MM;** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254 (1976)
- Brown PD, Tokuhisa JG, Reichelt M, Gershenzon J;** Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **62**: 471-481 (2003)
- Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M;** Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* **87**: 595-600 (2000)

- Case-Green SC, Southern EM**; Studies on the base pairing properties of deoxyinosine by solid phase hybridisation to oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **22**: 131-136 (1994)
- Chericoni S, Testai L, Calderone V, Flamini G, Nieri P, Morelli I, Martinotti E**; The xanthenes gentiacaulein and gentiakochianin are responsible for the vasodilator action of the roots of *Gentiana kochiana*. *Planta Med* **69**: 770-772 (2003)
- Chiang VL**; Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environ Chem Lett*: 143-146 (2006)
- Conti E, Franks NP, Brick P**; Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287-298 (1996)
- Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, Brick P**; Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J* **16**: 4174-4183 (1997)
- Cook NC, Samman S**; Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* **7**: 66-76 (1996)
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Berghe DV**; Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* **61**: 71-76 (1998)
- Costa MA, Bedgar DL, Moinuddin SG, Kim KW, Cardenas CL, Cochrane FC, Shockey JM, Helms GL, Amakura Y, Takahashi H, Milhollan JK, Davin LB, Browse J, Lewis NG**; Characterization *in vitro* and *in vivo* of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in *Arabidopsis*: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation. *Phytochemistry* **66**: 2072-2091 (2005)
- Cukovic D, Ehlting J, VanZiffle JA, Douglas CJ**; Structure and evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene families. *Biol Chem* **382**: 645-654 (2001)
- Dixon RA, Pavia NL**; Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097 (1995)
- Dopheide TAA, Crewther P, Davidson BE**; Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli* K-12. II. Kinetic properties. *J Biol Chem* **247**: 4447-4452 (1972)
- Ehlting J, Buttner D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich IE, Kombrink E**; Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J* **19**: 9-20 (1999)

- Ehltig J, Shin JJ, Douglas CJ**; Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant J* **27**: 455-465 (2001)
- Fleming A**; On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **10**: 226-236 (1929)
- Formica JV, Regelson W**; Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* **33**: 1061-1080 (1995)
- Fritzemeier KH, Cetin C, Kombrink E, Rohwer F, Tayler J, Scheel D, Hahlbrock K**; Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:coA ligase mRNAs in potato leaves infected with virulent or avirulent races of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol* **85**: 34-41 (1987)
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR**; Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *P Natl Acad Sci* **85**: 8998-9002 (1988)
- Fuchs R**; Hippokrates: Sämtliche Werke, (1895)
- Fulda M, Heinz E, Wolter FP**; 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. *MGG* **242**: 241-249 (1994)
- Fuller RW, Blunt JW, Boswell JL, Cardellina JH, 2nd, Boyd MR**; Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*. *J Nat Prod* **62**: 130-132 (1999)
- Gasson MJ, Kitamura Y, McLauchlan WR, Narbad A, Parr AJ, Parsons ELH, Payne J, Rhodes MJC, Walton NJ**; Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *J Biol Chem* **273**: 4163-4170 (1998)
- Geissler JF, Harwood CS, Gibson J**; Purification and properties of benzoate-coenzyme A ligase, a *Rhodospseudomonas palustris* enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *J Bacteriol* **170**: 1709-1714 (1988)
- Gil-Izquierdo A, Mellenthin A**; Identification and quantitation of flavonols in rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.) juice. *Eur Food Res Technol* **213**: 12-17 (2001)
- Grayer RJ, Kokubun T**; Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **56**: 253-263 (2001)
- Greeson JM, Sanford B, Monti DA**; St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology* **153**: 402-414 (2001)
- Gross GG, Zenk MH**; Darstellung und Eigenschaften von Coenzym A-Thiolester substituiertes Zimtsäuren. *Z Naturforsch B* **21b**: 683-690 (1966)

- Groweiss A, Cardellina JH, Boyd MR;** HIV-inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*. *J Nat Prod* **63**: 1537-1539 (2000)
- Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J;** On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* **36**: 317-322 (1987)
- Gulick AM, Starai VJ, Horswill AR, Homick KM, Escalante-Semerena JC;** The 1.75 Å crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphate and coenzyme A. *Biochemistry* **42**: 2866-2873 (2003)
- Hamberger B, Hahlbrock K;** The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2209-2214 (2004)
- Hay A-E, Helesbeux J-J, Duval O, Labaied M, Grellier P, Richomme P;** Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sci* **75**: 3077-3085 (2004)
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D;** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**: 1007-1011 (1993)
- Hertweck C, Jarvis AP, Xiang L, Moore BS, Oldham NJ;** A mechanism of benzoic acid biosynthesis in plants and bacteria that mirrors fatty acid β -oxidation. *Chem Bio Chem* **2**: 784 (2001)
- Hillebrand K, Leder B;** Auch die Vogelbeere kann erhebliche Dimensionen erreichen. *Allgemeine Forst Zeitung* **49**: 582-584 (1995)
- Hong D, Yin F, Hu LH, Lu P;** Sulfonated xanthenes from *Hypericum sampsonii*. *Phytochemistry* **65**: 2595-2598 (2004)
- Hrazdina G, Borejsza-Wysocki W;** Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissues to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry* **64**: 485-492 (2003)
- Hrazdina G, Borejsza-Wysocki W, Lester C;** Phytoalexin production in an apple cultivar resistant to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **87**: 868-876 (1997)
- Hu LH, Sim KY;** Cytotoxic polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives with an unusual adamantyl skeleton from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). *Org Lett* **1**: 879-882 (1999)
- Hu WJ, Kawaoka A, Tsai CJ, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, Chiang VL;** Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5407-5412 (1998)

- Jarvis AP, Schaaf O, Oldham NJ**; 3-Hydroxy-3-phenylpropanoic acid is an intermediate in the biosynthesis of benzoic acid and salicylic acid but benzaldehyde is not. *Planta* **212**: 119-126 (2000)
- Jogl G, Tong L**; Crystal structure of yeast acetyl-coenzyme A synthetase in complex with AMP. *Biochemistry* **43**: 1425-1431 (2004)
- Kajita S, Katayama Y, Omori S**; Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate: coenzyme A ligase. *Plant Cell Physiol* **37**: 957-965 (1996)
- Kim C-G, Yu T-W, Fryhle CB, Handa S, Floss HG**; 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC7N units in rifamycin and related antibiotics. *J Biol Chem* **273**: 6030-6040 (1998)
- Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA**; Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **58**: 17-24 (1998)
- Kirikae T, Ojima I, Kirikae F, Ma Z, Kuduk SD, Slater JC, Takeuchi CS, Bounaud P-Y, Nakano M**; Structural requirements of taxoids for nitric oxide and tumor necrosis factor production by murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 227-235 (1996)
- Klessig DF, Malamy J**; The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* **26**: 1439-1458 (1994)
- Kliebenstein DJ, D'Auria JC, Behere AS, Kim JH, Gunderson KL, Breen JN, Lee G, Gershenzon J, Last RL, Jander G**; Characterization of seed-specific benzyloxyglucosinolate mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **51**: 1062-1076 (2007)
- Knobloch KH, Hahlbrock K**; Isoenzymes of p-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max*. *Eur J Biochem* **52**: 311-320 (1975)
- Knobloch KH, Hahlbrock K**; 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. Partial purification, substrate specificity, and further properties. *Arch Biochem Biophys* **184**: 237-248 (1977)
- Kokubun T, Harborne JB**; Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the *Maloideae* (Rosaceae): Biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry* **40**: 1649-1654 (1995)
- Kokubun T, Harborne JB, Eagles J, Waterman PG**; Antifungal biphenyl compounds are the phytoalexins of the sapwood of *Sorbus aucuparia*. *Phytochemistry* **40**: 57-59 (1995)
- Kombrink E, Schmelzer E**; The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur J Plant Pathol* **107**: 69-78 (2001)

- Kuhn DN, Chappell J, Boudet A, Hahlbrock K;** Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1102-1106 (1984)
- Kumar A, Ellis BE;** 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression. *Plant Mol Biol* **51**: 327-340 (2003)
- Laemmli UK;** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685 (1970)
- Lee D, Douglas CJ;** Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene family. cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins. *Plant Physiol* **112**: 193-205 (1996)
- Lee D, Meyer K, Chapple C, Douglas CJ;** Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition. *Plant Cell* **9**: 1985-1998 (1997)
- Lehmler H-J, Robertson LW;** Synthesis of polychlorinated biphenyls (PCBs) using the Suzuki-coupling. *Chemosphere* **45**: 137-143 (2001)
- Lenta NB, Vonthron-Sénécheau C, Weniger B, Prasad Devkota K, Ngoupayo J, Kaiser M, Naz Q, Iqbal Choudhary M, Tsamo E, Sewald N;** Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. *Molecules* **12**: 1548-1557 (2007)
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL;** Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179 (1993)
- Liang P, Pardee AB;** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971 (1992)
- Lindermayr C, Fliegmann J, Ebel J;** Deletion of a single amino acid residue from different 4-coumarate:CoA ligases from soybean results in the generation of new substrate specificities. *J Biol Chem* **278**: 2781-2786 (2003)
- Lindermayr C, Mollers B, Fliegmann J, Uhlmann A, Lottspeich F, Meimberg H, Ebel J;** Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. *Eur J Biochem* **269**: 1304-1315 (2002)
- Linsmaier EM, Skoog F;** Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* **18**: 100-127 (1965)
- Liu B, Beuerle T, Klundt T, Beerhues L;** Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta* **218**: 492-496 (2004)

- Liu B, Falkenstein-Paul H, Schmidt W, Beerhues L;** Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant J* **34**: 847-855 (2003)
- Liu B, Raeth T, Beuerle T, Beerhues L;** Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase. *Planta* **225**: 1495-1503 (2007)
- Löscher R, Heide L;** Biosynthesis of *p*-hydroxybenzoate from *p*-coumarate and *p*-coumaroyl-coenzyme A in cell-free extracts of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Plant Physiol* **106**: 271-279 (1994)
- Lozoya E, Hoffmann H, Douglas C, Schulz W, Scheel D, Hahlbrock K;** Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate: CoA ligase genes in parsley. *Eur J Biochem* **176**: 661-667 (1988)
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I;** Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004 (1990)
- Mandel M, Higa A;** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162 (1970)
- May JJ, Kessler N, Marahiel MA, Stubbs MT;** Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12120-12125 (2002)
- McOmie JFW, Watts ML, West DE;** Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide. *Tetrahedron* **24**: 2289-2292 (1968)
- Miyaura N, Yanagi T, Suzuki A;** The palladium-catalyzed cross-coupling reaction of phenylboronic acid with haloarenes in the presence of bases. *Synthetic Commun* **11**: 513-519 (1981)
- Morel C, Seraphin D, Teyrouz A, Larcher G, Bouchara JP, Litaudon M, Richomme P, Bruneton J;** New and antifungal xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Med* **68**: 41-44 (2002)
- Muljono RAB, Scheffer JJC, Verpoorte R;** Isochorismate is an intermediate in 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Physiol Biochem* **40**: 231-234 (2002)
- Mullen W, McGinn J, Lean MEJ, MacLean MR, Gardner P, Duthie GG, Yokota T, Crozier A;** Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J Agric Food Chem* **50**: 5191-5196 (2002)
- Murashige T, Skoog F;** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* **15**: 473-497 (1962)

- Nakatani K, Nakahata N, Arakawa T, Yasuda H, Ohizumi Y;** Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochem Pharmacol* **63**: 73-79 (2002)
- Narasimhachari N, von Rudloff E;** The chemical composition of the wood extractives of *Sorbus decora* (SARG.) SCHNEID. *Can J Chem* **40**: 1118–1122 (1962)
- Nelson-Jones B, Briggs D, Smith G;** The origin of intermediate species of the genus *Sorbus*. *Theor Appl Genet* **105**: 953-963 (2002)
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA;** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**: 418-425 (2001)
- Nilsson M, Norin T;** Syntheses of aucuparin and methoxyaucuparin. *Acta Chem Scand* **17**: 1157-1159 (1963)
- Nkengfack AE, Mkounga P, Meyer M, Fomum ZT, Bodo B;** Globulixanthenes C, D and E: three prenylated xanthenes with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*. *Phytochemistry* **61**: 181-187 (2002)
- Ober D;** Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci* **10**: 444-449 (2005)
- Peres V, Nagem TJ, de Oliveira FF;** Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry* **55**: 683-710 (2000)
- Peters S, Schmidt W, Beerhues L;** Regioselective oxidative phenol couplings of 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone in cell cultures of *Centaureum erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. *Planta* **204**: 64-69 (1997)
- Pietrowska-Borek M, Stuible H, Kombrink E, Guranowski A;** 4-Coumarate:coenzyme A ligase has the catalytic capacity to synthesize and reuse various (di)adenosine polyphosphates. *Plant Physiol* **131**: 1401-1410 (2003)
- Podstolski A, Havkin-Frenkel D, Malinowski J, Blount JW, Kourteva G, Dixon RA;** Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* **61**: 611-620 (2002)
- Raguso RA, Pichersky E;** Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): Recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Syst Evol* **194**: 55-67 (1995)
- Rakwal R, Agrawal GK, Yonekura M, Kodama O;** Naringenin 7-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the flavanone phytoalexin sakuranetin from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* **155**: 213-221 (2000)

- Ramadan H**; Molecular analysis of coenzyme A ligase from benzoate-metabolizing *Sorbus aucuparia* cell cultures. Dissertation TU Braunschweig, Braunschweig (2006)
- Ribnicky DM, Shulaev VV, Raskin I**; Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **118**: 565-572 (1998)
- Saljoughian M, Morimoto H, Williams PG**; A general synthesis of very high specific activity tritiummethyl iodide. *J Chem Soc* **1**: 1803-1808 (1990)
- Sambrook J, MacCallum P**; Molecular cloning: a laboratory manual (3. Auflage). Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)
- Sanchez LB, Galperin MY, Muller M**; Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of acyl-CoA synthetases (nucleoside diphosphate-forming). *J Biol Chem* **275**: 5794-5803 (2000)
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR**; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467 (1977)
- Schimmer O, Mauthner H**; Polymethoxylated xanthenes from the herb of *Centaurium erythraea* with strong antimutagenic properties in *Salmonella typhimurium*. *Planta Med* **6**: 561-564 (1996)
- Schmidt W, Abd El-Mawla AMA, Wolfender JL, Hostettmann K, Beerhues, L**; Xanthenes in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta Med* **66**: 380-381 (2000)
- Schneider K, Hovel K, Witzel K, Hamberger B, Schomburg D, Kombrink E, Stuible HP**; The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8601-8606 (2003)
- Schnitzler Jr-P, Madlung J, Rose A, Ulrich Seitz H**; Biosynthesis of p-hydroxybenzoic acid in elicitor-treated carrot cell cultures. *Planta* **188**: 594-600 (1992)
- Shockey JM, Fulda MS, Browse J**; Arabidopsis contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme a synthetases. *Plant Physiol* **132**: 1065-1076 (2003)
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I**; Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**: 718-721 (1997)
- Sircar D, Mitra A**; Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. *J Plant Physiol* (2007)

- Stuible H, Buttner D, Ehltng J, Hahlbrock K, Kombrink E;** 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 (2000)
- Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Chari VM, Vermes B, Wagner H, Hostettmann K;** Inhibition of type A and type B monoamine oxidases by naturally occurring xanthenes. *Planta Med* **42**: 17-21 (1981)
- The_Arabidopsis_Genome_Initiative;** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815 (2000)
- Thompson WR, Meinwald J, Aneshansley D, Eisner T;** Flavonols: Pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower. *Science* **177**: 528-530 (1972)
- Turgay K, Krause M, Marahiel MA;** Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol Microbiol* **6**: 529-546 (1992)
- Turner JG, Ellis C, Devoto A;** The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **14 (Suppl)**: 153-164 (2002)
- Verstl A;** Diskret und genügsam – die Eberesche/ *Sorbus aucuparia* ist Baum des Jahres 1997. *Deutsche Baumschule* **49**: 263-267 (1997)
- Villegas M, Brodelius PE, Kylin A;** Elicitor-induced hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant cell suspension cultures. *PhysiolPlantarum* **78**: 414-420 (1990)
- Wang C-Z, Maier UH, Keil M, Zenk MH, Bacher A, Rohdich F, Eisenreich W;** Phenylalanine-independent biosynthesis of 1,3,5,8-tetrahydroxyxanthone. A retrobiosynthetic NMR study with root cultures of *Swertia chirata*. *Eur J Biochem* **270**: 2950-2958 (2003)
- Wang HK, Xia Y, Yang ZY, Natschke SL, Lee KH;** Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv Exp Med Biol* **439**: 191-225 (1998)
- Watanabe K, Ishiguri Y, Nonaka F, Morita A;** Isolation and identification of aucuparin as a phytoalexin from *Eriobotrya japonica* L. *Agr Biol Chem TOKYO* **46**: 567-568 (1982)
- Werner I, Bacher A, Eisenreich W;** Retrobiosynthetic NMR studies with ¹³C-labeled glucose. Formation of gallic acid in plants and fungi. *J Biol Chem* **272**: 25474-25482 (1997)
- Wichtl M;** Teedrogen und Phytopharmaka (3. Auflage). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1997)

- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM;** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565 (2001)
- Yamauchi K, Yasuda S, Hamada K, Tsutsumi Y, Fukushima K;** Multiform biosynthetic pathway of syringyl lignin in angiosperms. *Planta* **216**: 496-501 (2003)
- Yazaki K, Heide L, Tabata M;** Formation of *p*-hydroxybenzoic acid from *p*-coumaric acid by cell free extract of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochemistry* **30**: 2233-2236 (1990)
- Yazaki K, Ogawa A, Tabata M;** Isolation and characterization of two cDNAs encoding 4-coumarate:CoA ligase in *Lithospermum* cell cultures. *Plant Cell Physiol* **36**: 1319-1329 (1995)
- Zeng JZ, Sun DF, Wang L, Cao X, Qi JB, Yang T, Hu CQ, Liu W, Zhang XK;** *Hypericum sampsonii* induces apoptosis and nuclear export of retinoid X receptor-alpha. *Carcinogenesis* **27**: 1991-2000 (2006)
- Zenk MH;** Biosynthese von Vanillin in *Vanilla planifolia* Andr. *Z Pflanzenphysiol* **53**: 404-414 (1965)
- Zhang S-H, Yang Q, Ma R-C;** *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* infection induced "defense lignin" accumulation and lignin biosynthetic gene expression in chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *J Integr Plant Biol* **49**: 993-1002 (2007)
- Zhao S-JH, Z-B; Liu,D; Leung, F.C.C.;** Two divergent members of 4-coumarate: coenzyme A ligase from *Salvia miltiorrhiza* Bunge: cDNA cloning and functional study. *J Integr Plant Biol* **48**: 1355-1364 (2006)

VIII. Anhang

Basensequenz von Sa4CL2

ATGGAGCACCATCACAAAGATGATGAGTTCATTTTCCGGTCCAACTCTCTGATATTTACATCCCAAACCACTCC
CTCTTCACACCTACTGCTTCGAAAACATCTCCCAATTCATGGACCGCCCCTGCTTGATCAACGGCAACAACGGCG
ACACCTTCACCTACGCCGACGTGAGCTCACCTCCCGAAAGGTTGCCGCGGGGCTCCACAAAATCGGCATTAC
CAAACCGACGTCATCATGCTCCTCCTCCAAAACCTGCCCTGAATTCGTCTTTGCATTTCTCGGCGCCTCCAATATCG
GCGCAGTCGTACCACCGCCAACCCCTTCTACACTCCGGCCGAGATGGCCAAGCAGGCAAGAGCATCCAATGCC
AAACTCATCATAACGCAGTCGGCTTACGTGGACAAGGTGAAGGACTTCGCACTTAAAAACGACGTGAGATCAT
GGTTCGTGACAACGCGGAACTGAGAAAGATGGTAATACTTATCATCACTTCTCGGAGCTGACTTCGGCGGACG
AGAATGACATCCCGCGGGTAAAATAAACCCCGAAGACGTGTTGCGCTGCCGTATTCTTCCGGGACGACGGGG
CTACCTAAAGGGGTTATGCTGACGCACAAAGGGTTGGTGACGAGCGTGGCGCAACAGGTGGACGGAGAGAATC
CGAATTTGATTTCCACAGTGAGGACGTGATCCTCTGCGTGCTGCCCTTGTTCATATCTACTCCCTCAATTCAGT
GTTTCTCTGCGGACTCAGAGTTGGGGCGGCATACTGATCATGCAGAAGTTTGAGATCACCAAGTTGTTGGAGC
TGGTGGAGAATTACAAGGTGACGATTGCGCCTTTGTACCTCCGATCGTTTTGAGTATTGCCAAAAGCCCCGACT
TAGATCGGTACGACTTGTCATCGATAAGGATGGTATGTCCGGTGCGGCGCCGATGGGGAAGGAGCTTGAGGA
TACAGTGAGGGCTAAGTTACCTAGTGCCAACTTGGACAGGGGTATGGAATGACAGAGGCTGGACCTGTGCTGT
CAATGTGCTTAGCATTTGCAAAGGAACCATGTGAGATAAAATCAGGTGCGTGCGGGACTGTTGTAAGAAATGCA
GAGATGAAAATTGTTGACCCTGATACGGGTGCTTCGCTTCCGCGAAATCAAGCTGGAGAGATTTGCATCAGAGG
TAGCCAAATCATGAAAGTTATCTTAATGATCCTGAAGCCACGGAGAGAACCGTAGACAAACAGGGATGGTTGC
ACACAGGTGATATAGGGTACATCGACGGTATGACGAGCTTTCATCGTCGACCGATTAAAGGAACTCATCAAAT
ACAAAGGGTTCCAAGTGCCCCGGCTGAGCTTGAAGCCATGCTGATTGCCCATCCCAACATCTCCGACGCTGCT
GTTGTACCTATGAAGGATGAAGCTGCAGGTGAAATCCTGTTGCATTTGTTGTGAGATCGAACGGTTCCAAGATC
TCCGAAGATGACATCAAACAATACATCTCAAACAGGTGGTCTTTTATAAGAGAATAGGTGCGGTTTTCTTCACAG
ACAAAATACCCAAGGCTCCTTCCGGCAAAATCTTGAGAAAAGACTTGAGAGCAAAGCTGGCTGCAAGCCTACCC
AATTAG

Aminosäuresequenz Sa4CL2

MEHHHKDDEFIFRSKLSDIYIPNHLPLHTYCFENISQFMDRPCLINGNNGDTFTYADVELTSRKVAAGLHKIGIHQTD
VIMLLLQNCPEFVFAFLGASNIGAVVTTANPFYTPAEMAKQARASNAKLIITQSAYVDKVKDFALKNDVEIMVVDNAE
TEKDGNTRYHHFSELTADENDIPAVKINPEDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVDGENPNLYFHSEDV
ILCVLPLFHIYSLNSVFLCGLRVGAAILIMQKFEITKLELVENYKVTIAPFVPPIVLSIAKSPDLDRYDLSIRMVMSG
APMGKELEDTVRAKLPSAKLGQGYGMTEAGPVLMSCLAFAKEPCEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGASLPRNQA
GEICIRGSQIMKGYLNDPEATERTVDKQGWLHTGDIGYIDGDDELFIVDRLKELIKYKGFQVAPAELEAMLIAHPNIS
DAAVVPMKDEAAGEIPVAFVVRNNGSKISEDDIKQYISKQVVFYKRIGRVFFTDKIPKAPSGKILRKDLRAKLAASLP
N.

Basensequenz des Fragments Sa4CL1

GGGACGACGGGGCTGCCGAAGGGGGTGATGCTAACGCACAAGGGTCTTGTGACAAGCGTTGCTCAGCAGGTG
GACGGGGAAAATCCCAACTTGTATTATAGCACCGACGACGTCGTCTTATGCGTGCTGCCACTTTTTCATATATATT
CTTTGAACTCGGTATTGCTTTGTGGACTTAGAGCCGGAGCTGCCATTTTATGATGATGAACAAGTTTGAGATTGTTTC
TCTGTTGGGGTTGATCGACAAGTACAAGGTTAGTATTGCACCGATCGTGCCGCCGATAGTGTTGGCCATCGCCA
AGTTTCCCGATCTTGATAAGTACGATTTGTCGTCAATTCGAGTGCTTAAGTGTGGAGGGGCACCCCTTGGGAAGG
AGCTTGAGGATACTGTGAGAGCCAAGTTTCCCAATGTCACACTTGGTCAGGGATATGGAATGACAGAGGCAGGG
CCAGTATTGACCATGTCATTGGCATTGCCAAGCAACCCCTCGAGGTCAAACCAGGTGGATGTGGCACCGTCGTC
CGAAATGCAGAGCTCAAGATCGTTGATCCTGAATCTGGTGCTTCTTTGCCACGCAACCAGCCTGGAGAGATTTGC
ATTAGAGGTGACCAGATCATGAAAGGTTATCTTAATGATCCGGAGTCGACAAGGACAACCATAGACAAGGAAGG
TTGGCTACACACCGGTGATATAGGCTTCATTGATGATGATGATGAGCTATTCATTGTTGATCGGTTGAAGGAACT
GATCAAATACAAAGGATTTCAAGTGGCCCCTGCTGAACCTTGAAGCCTTGCTCATCACCCATCCTAGTGTTTCTGAT
GCTGCTGTTGTCCAATGAAGGATGAGGCAGCTGGAGAGGTTCCGGTTGCATTTGTAGTAAGGTCAAATAATTCT
CAGCTCACTGAGGACGAAGTCAAGCAATTTATCTCTAAACAGGTTGTATTTTACAAAAGAATAAATCGAGTATTTT
TCATCGAAGCCATTCCGAAGTCACCGTCGGGCAAATCTTGCGGAAGGACTTGAGAGCAAAGCTTGCTGCTGGG
TTTCCAAACT

Aminosäuresequenz des Fragments Sa4CL1

GTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVDGENPNLYSTDDVVLVLPFHYSLSVLLCGLRAGAAILMMNKFEIVSLLG
LIDKYKVSIAPIVPIVLAIKFPDLDKYDLSSIRVLKCGGAPLGKELEDTVRAKFPNVTLGQGYGMTEAGPVLTMSLAF
AKQPFVVKPGGCGTVVRNAELKIVDPESGASLPRNQPGEICIRGDQIMKGYLNDPESTRTTIDKEGWLHTGDIGFID
DDDELFI^VDRLKELIKYKGFQVAPAELEALLITHPSVSDAAVVPKDEAAGEVPVAFVVRSNNSQLTEDEVKQFISKQ
VVFYKRINRVFFIEAIPKSPSGKILRKDLRAKLAAGFPN.

Basensequenz von At1g75960

ATGGAAGATTTGAAGCCAAGTGCCGCTAACTCGTTACCATTGACACTGTTAGGCTTTCTTGAGAGAGCAGCCACC
 GTGTATGGAGACTGTACCTCCATCGTTTACGGCAATTCCACCGTGTACACATGGCGAGAAACGAATCACCGTTGC
 CTCTGCGTCGCGTCTGCTCTGTCTTCCATTGGAATAGGAAGATCCGACGTTGTCTCTGTCTATCTGCTAATACTC
 CGGAAATGTACGAGCTCCAGTTTTCCGTTCCGATGTCTGGCGCGATCCTTAACAACATCAATACCCGCCTCGACG
 CGCGAACCGTCTCTGTTCTTCTCCGCCATTGCGAGTCTAAGCTGCTCTTCGTGCGACTTCTTTACTCCGATCTCGC
 TGTCGAAGCGATCACGATGTTGCTCAATCCGCCGATTCTCGTCCTAATCGCCAATGAGGAGGAGGAAGAAGGAG
 GAGCTGAAGTAACGGAGCGTTCAAAATTCTGTTACTTGTACAGTGATCTAATCACTAGAGGGAATCCGGATTTTA
 AATGGATCCGACCCGGAAGTGAATGGGACCCGATTGTGGTCAATTACACATCAGGTACGACGTCGTCTCCTAAA
 GGAGTGGTTCATTGCCACAGGGGTATATTCGTCATGACGCTTGATTCCCTAACCGATTGGGCCGTACCGAAAACC
 CCGGTTTACTTATGGACCTTACCGATATTTACGCCAACGGTTGGACCTATCCATGGGGAATCGCCGCCGTGCGA
 GGAACATAACGTCTGTGTGCGTAACTCCACGCGCCGTCAATATACCATCTAATCCGTGATCACGGCGTGACTCAC
 ATGTACGGCGCACCAATAGTGCTTCAGATTCTATCGGCGAGTCAAGAATCTGATCAGCCTCTTAAGAGTCCGGTC
 AATTTCTTAACCGCCGGTTCTTCTCCGCCAGCTACGGTGCTTCTCCGCGCCGAGTCTCTAGGTTTCATCGTCAGT
 CACGGTTACGGATTAACGGAGACAGCCGGTGTGATCGTCTCCTGCGCGTGGAAGCCAACTGGAATCGGTTACC
 GGCGAGTGATCAAGCGCAATTGAAATCACGGCAAGGAGTGAGAACCGTCGGATTTAGCGAAATCGATGTAGTGG
 ATCCAGAATCAGGTCGGAGCGTGGAGAGAGACGGAGAAACAGTCGGAGAAATAGTGTTGAGAGGGAGTTCAAT
 CATGCTCGGATACTTAAAAAATCCGATCGGAACTCAAAATTCGTTTAAAAACGGGTGGTCTTACCGGAGACCT
 CGGTGTGATTCACGGGGATGGTACTTAGAGATTAAGATAGATCGAAAGATGTGATTATTTACGGAGGAGAGA
 ATGTGAGTAGTGTGGAAGTGGAGGCGGTGTTGTACACGAATCCGGCGGTGAATGAAGCGGCGGTGGTGGCTAG
 ACCTGACGAGTTTTGGGGAGAGACGCCGTGTGCTTTTGTAGTTTAAAACCCGGGTTGACCCGGAAACCAACGG
 ATAAGGAGATTATAGAGTATTGCAAATATAAAATGCCACGTTACATGGCTCCTAAAACGGTCTCGTTTTCTTGAAGA
 GTTACCAAAGACTTCCACTGGGAAGATTATAAAGTCATTGCTTAAAGAGATTGCCAAAAACATGTAAAA

Aminosäuresequenz von At1g75960

MEDLKPSAANSPLPLLLGFLERAATVYGDCTSIVYGNSTVYTWRETNHRCLCVASALSSIGIGRSDVVSVLSANTPEM
 YELQFSVPMMSGAILNNINTRLDARTVSVLLRHESKLLFVDFYSDLAVEAITMLLNPPILVLIANEEEEEGGAEVTERS
 KFCYLYSDLITRGNPDFKWIRPGSEWDPIVVNYTSGTTSSPKGVVHCHRGIFVMTLDSLTDWAVPKTPVYLVWTLPIFH
 ANGWTYPWGIAAVGGTNVCVRKLNHAPSIYHLIRDHGVTHMYGAPIVLQILSASQESDQPLKSPVNFMTAGSSPPATV
 LLRAESLGFIVSHGYGLTETAGVIVSCAWKPNWNRLPASDQAQLKSRQGVRTVGFSEIDVVDPESGRSVERDGETV
 GEIVLRGSSIMLGYLKNPIGTQNSFKNGWFFTGLGVIHGDGYLEIKDRSKDVIISGGENVSSVEVEAVLYTNPAVNE
 AAVVARPDEFWGETPCAFVSLKPLTRKPTDKEIIEYCKYKMPRYMAPKTVSFLEELPKTSTGKIIKSLLKEIAKNM.

Basensequenz von At1g21540

ATGGAACTCTTACTTCCACACCCATCAAACCTCAACTCCACTCACCGTCCTCGGCTTCTTAGACCGAGCCGCTTCCG
TCTATGGTGACTGTCCGTCCATCCTCCACACTGCAAACACCGTTCATACTTGGTCCGAAACACATAACCGCTGTCT
CCGTATCGCATCGGCTCTAACTTCCTCCTCTATCGGAATTAACAAGGCCAAGTCGTCTCTGTCTGCGTGGGTCCCAA
CGTCCCGTCCGTCTATGAGCTTCAGTTTGCTGTCCCAATGTCCGGAGCCATCTTAAACAACATCAACCCTCGCTTA
GACGCACACGCACTCTCTGTCCTCCTGCGTCACAGCGAATCCAGACTCGTTTTCGTCGACCACCGTTCTATATCC
TTAGTCCTTGAAGCAGTTTCATTATTACACAACACGAGAAACCTCACCTCGTCCTCCTGGACGATGACCAAGAG
AACGATTCTTCATCCGCATCAGATTTTCTTGACACGTACGAAGAAATTATGGAGAGAGGAAATTCAAGATTCAAGT
GGATCCGTCTCAAACCGAATGGCAACCAATGGTTCTTAACTATACTTCCGGAACGACGTCTCTCCCAAGGGAG
TGGTACTTAGCCACAGAGCGATTTTCATGCTCACTGTTAGCTCCTTGCTTGATTGGTCAGTACCAAACCGGCCAG
TTTACTTGTGGACTCTACCGATGTTTCACGCCAATGGTTGGGGTTACACTTGGGGCACCGCAGCGGTTGGAGCC
ACCAACATCTGCACGCGTAGAGTCGACGCACCGACTATTTACAACCTTGATCGATAAGCACAATGTGACCCACATG
TGTGCTGCACCTATGGTTCTCAACATGCTAATTAACTATCCATTAAGTACGCCGCTCAAGAACCCGGTTCAGGTTA
TGACCTCTGGAGCTCCCCACCAGCAACCATTATCTCCCGAGCGGAGTCACTTGGTTTCAACGTCAGCCACTCAT
ACGGTTTAAACAGAGACTAGCGGTCCGTTGTGTGTCATGTGCTTGAAGCCTAAGTGGGACCATCTTGATCCATTG
GAGAGAGCTAGGCTGAAGTCAAGGCAAGGAGTAAGAACAACCTCGGATTCACGGAAGTCGATGTAAGGGATCGAA
AAACAGGAAAGAGTGTGAAACACGACGGAGTTTCGGTTGGAGAGATTGTTTTCAGAGGCAGCTCAGTCATGTTG
GGATACTACAAAGACCCTCAAGGAACTGCGGCTTGTATGAGAGAGGACGGGTGGTTCTACTCTGGAGACATCGG
GGTTATACACAAAGATGGTTACTTGGAGATCAAAGATCGGTCAAAGATGTGATCATATGCGGAGGAGAAAATAT
AAGCAGCGCAGAGATTGAGACGGTTCTGTATACAAATCCGGTGGTGAAGGAAGCTGCGGTGGTGGCTAAACCG
GATAAGATGTGGGGAGAGACACCATGTGCTTTTGTGAGCTTGAAGTGTGATAACAATGGTGATGGTTCCGGTTCC
CGTGACCGAGAGAGAGATAAGGGAGTTTTGTAAGACGAAGTTACCTAAGTACATGGTTCCGAGGAAAGTGATCT
TTCAGGAGGAACTTCCCAAGACTTCCACAGGAAAAATTCAGAAGTTTTTGCTAAGACAAATGGCTAAGACCCTGT
CTTGA

Aminosäuresequenz von At1g21540

MELLPHPSNSTPLTVLGLFDRAASVYGDPCPSILHTANTVHTWSETHNRCLRIASALTSSSIGIKQGQVSVVGNPVP
SVYELQFAVPMMSGAILNNINPRLDAHAHEIKELSVLLRHSESRLVFDHRSISLVLEAVSLFTQHEKPHLVLLDDQEN
DSSASDFLDTYEEIMERGNSRFKWIRPQTEWQPMVLNYTSGTTSSPKGVVLSHRAIFMLTVSSLLDWSVPNRPVYL
WTLPMFHANGWGYTWGTAAVGATNICTRRVDAPTIYNLIDKHNVTHMCAAPMVLNMLINYPLSTPLKNPVQVMTSG
APPPATIISRAESLGFNVSHSYGLTETSGPVVSCAWKPKWDHLDPLERARLKSQRQGVRTLGFTEVDVRDRKTGKSVK
HDGVSVGEIVFRGSSVMLGYKDPQGTAAACMREDGWFYSGDIGVIHKDGYLEIKDRSKDVIICGGENISSAEIETVL
YTNPVVKEAAVAKPDKMWGETPCAFVSLKCDNNGDGSVPVTEREIREFCKTKLPKYMVPRKVIFQEELPKTSTGKI
QKFLLRQMAKTLS.

Danksagungen

Für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit, die stete Bereitschaft zur Diskussion und die mir eingeräumten Freiheiten danke ich Herrn Prof. Dr. Beerhues.

Bei Herrn Prof. Dr. Selmar bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats sowie bei Herrn Prof. Dr. Engelhardt für den Beitrag in der Prüfungskommission.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Liu (VR China) für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis während des DAAD-Stipendiums am Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing. Es war ein einmaliges Erlebnis.

Herrn Dr. Lindigkeit möchte ich für die Einweisung in Servertechnologien und die guten Gespräche über Dienstliches und auch über weltliche Nebensachen sehr danken. Rainer, es hat immer viel Spaß gemacht!

Ich danke Herrn Dr. Beuerle für die kompetente und unkomplizierte Einweisung in die Synthese und Analytik von Naturstoffen. Die Zeit für einen „Mokka“ kam dabei nicht zu kurz. Danke Till!

Eine angenehme Arbeitsatmosphäre, Rat und Tat verdanke ich den Kollegen Dr. Torben Räth, Susanne Kühle, Dr. Nora Feye, Ines Rahaus, Inis Winde, Antje Plock und vielen ungenannten guten Geistern des IPB. Ich habe die Zeit und die gute Stimmung mit Euch immer sehr genossen. (coffee) (smoke) ;)

Frau Andreia Carjila danke ich für die Aufnahme und die Einweisung in der OC.

Ich danke meiner Familie für das Vertrauen und die Unterstützung durch die Jahre des Studiums und der Promotion.

Du bist die Kraft, der Trost und das Licht. Wie wir das immer so machen...

Danke Heike

„Es geht mir gut, es geht mir sehr sehr gut“ Eins Zwo

