

I. EINLEITUNG:

Die Untersuchung des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels

Eine den Pflanzen typische Eigenschaft ist die Synthese einer großen Mannigfaltigkeit von Sekundärmetaboliten. Im Gegensatz zu den sogenannten primären Metaboliten, wie beispielsweise Aminosäuren, Fettsäuren, Cytochromen und Chlorophyllen, die in allen Pflanzen vorkommen und dort auch überall die gleichen Funktionen, z. B. in der Photosynthese, Atmung oder Lipidsynthese, erfüllen, wurden bereits mehr als 100.000 niedermolekulare Substanzen identifiziert, die oft spezifisch für Familien von Pflanzen oder sogar für einzelne Spezies sind. Im Gegensatz zu ihrer Bezeichnung ist mittlerweile bekannt, dass sekundäre Pflanzenstoffe eine wichtige Rolle für die sie produzierende Pflanze spielen. Lignin, das nach der Zellulose die häufigste organische Substanz in der Natur darstellt, ist als Stützbaustoff der verholzten Pflanzenteile essentiell für die Stabilität der Landpflanzen. Weitere sekundäre Pflanzenstoffe sind als Farbstoffe und Signalmoleküle (Phytohormone) an diversen ökologischen Prozessen beteiligt, so an der Kommunikation zwischen Pflanzenorganen und Pflanzen. Als natürliche Pestizide spielen sie eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Herbivoren, Mikroorganismen und Viren.

Der pflanzliche Sekundärmetabolismus ist ein Beispiel für die Diversität von Stoffwechselvorgängen in der Natur. Die verwirrende Anzahl von Strukturen und Molekülen wird von einer ebenfalls beeindruckenden Anzahl von Enzymen modifiziert, oft in spezifischen Substrat-Enzym-Beziehungen. Die differenzielle Lokalisation von Enzymen und Substraten in Organen, Geweben oder Zellkompartimenten sowie die Bildung von Enzymkomplexen, die eine direkte Weitergabe von Zwischenprodukten ermöglichen, führen zu einer selektiven Produktion von sekundären Metaboliten und erfordern ihren zielgerichteten Transport. Zusammen mit einer vielschichtigen Regulation der Stoffwechselvorgänge in der Entwicklung, aber auch in Reaktion auf Stress und Pathogene, erschwert diese Komplexität die Entwicklung von allgemeinen Konzepten zur Untersuchung des sekundären Metabolismus. In den letzten Jahren hat sich immer deutlicher gezeigt, dass nur die Kombination von biochemischen, genetischen und bioinformatischen Methoden zu einer realistischen Einschätzung von Abläufen in einem Stoffwechsel-Netzwerk führt.

In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden zunächst nur 36 sekundäre Metabolite beschrieben (Chapple *et al.* 1994), mittlerweile konnte diese Zahl auf über 170 aufgestockt werden (D'Auria und Gershenzon 2005). Die Analyse des *Arabidopsis*-Genoms ordnet einer großen Anzahl noch uncharakterisierter Proteine Funktionen im Sekundärstoffwechsel zu, was auf weitere, unentdeckte Sekundärstoffe in dieser Pflanze schließen lässt (D'Auria und Gershenzon 2005). Dies führt zu einem weiteren Problem der heutigen Forschung. Die Sequenzierung von Genomen ergibt eine große Zahl von Genen, über deren Expression Daten

vorliegen, deren Funktion aber unbekannt ist. Besonders im Sekundärstoffwechsel scheint dabei der Vergleich von allgemeinen Sequenzähnlichkeiten nur bedingt Rückschlüsse auf die von den Enzymen durchgeführten Reaktionen zuzulassen, da bereits geringe Unterschiede in der Molekülstruktur den Unterschied zwischen Aktivität und Inaktivität gegenüber einem Substrat ausmachen können (Blechert *et al.* 1995; Fridman und Pichersky 2005). Eine aktuelle Fragestellung ist daher die Suche nach Methoden zum Testen der Funktion großer Enzymgruppen.

Der Phenylpropanoidstoffwechsel

Eine wichtige Gruppe von Sekundärmetaboliten ist die große Zahl von phenolischen Substanzen. Neben einfachen Phenolen gehören dazu unter anderem Flavonoide, Stilbene, Tannine, Lignane und Lignin. Viele dieser Moleküle haben wichtige Funktionen, so Stilbene, Cumarine und Isoflavonoide als Phytoalexine, Flavonoide als UV-Schutzpigmente, Anthocyane als Blütenfarbstoffe und Lignin und Lignane als Gerüstmaterial, um Pflanzen Stabilität zu verleihen. Alle diese Substanzen werden hauptsächlich aus Phenylalanin synthetisiert, das ein Produkt des Shikimatweges, also des primären Pflanzenstoffwechsels, ist. Da die aus dieser Aminosäure abgeleiteten Phenole einen Benzolring mit einer C₃-Seitenkette enthalten, fasst man sie unter der Sammelbezeichnung Phenylpropanoide zusammen (Heldt, 1999).

Die Startreaktion des Phenylpropanoidstoffwechsels ist eine Desaminierung des Phenylalanins durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL). Durch Abspaltung der Aminogruppe wird eine Kohlenstoffdoppelbindung gebildet und es entsteht *trans*-Zimtsäure (Abbildung 1). Durch eine Reihe von Hydroxylierungs- und Methylierungsschritten, die durch Cytochrom P₄₅₀-abhängige Hydroxylasen (C₄H, C₃H, F₅H) bzw. O-Methyltransferasen (COMT) katalysiert werden, wird die Zimtsäure in Cumar-, Kaffee-, Ferula-, 5-Hydroxyferula- und Sinapinsäure umgewandelt. Diese Zimtsäurederivate werden durch 4-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL) in die entsprechenden CoA-Ester überführt und so für die weiterführenden Reaktionen aktiviert. Durch die Cinnamoyl-CoA-Reduktase (CCR) und die Cinnamoyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD) werden die korrespondierenden Zimtaldehyde und Zimtalkohole synthetisiert, die die Monomere des Lignins bilden. Alternativ kann Cumaroyl-CoA über die Chalcon-Synthetase in die Flavonoid-Biosynthese geleitet werden.

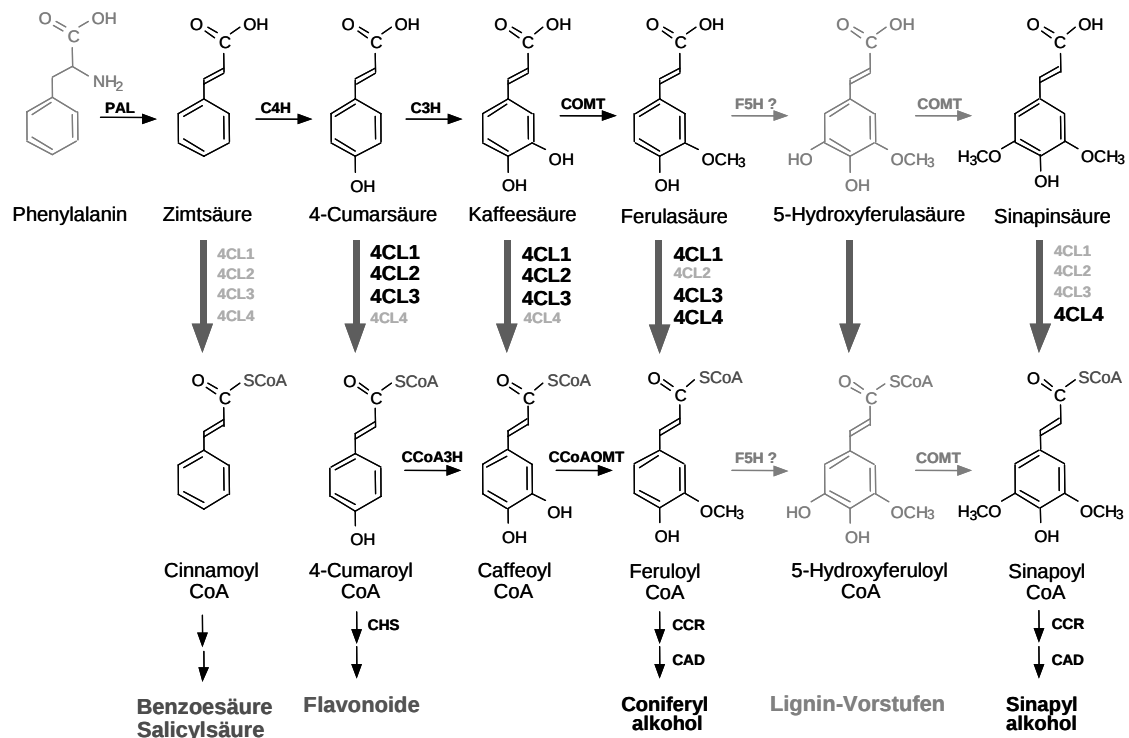


Abb. 1: Übersicht über den Phenylpropanoidstoffwechsel

Beteiligte Enzyme: PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H: Cinnamat-4-Hydroxylase, C3H: Cinnamat-3-Hydroxylase, COMT: Caffeoyl-O-methyltransferase, F5H: Ferulat-5-Hydroxylase, 4CL: 4Cumarat:CoA-Ligase, CCoA3H: Caffeoyl-CoA-3-Hydroxylase, CCoAOMT: Caffeoyl-CoA-O-methyltransferase, CCR: Cinnamoyl-CoA-Reduktase, CAD: Cinnamoyl-Alkohol-Dehydrogenase, 4CL1-4: Isoformen der 4CL, grau gedruckte Isoformen zeigen keine oder nur geringe Aktivität gegenüber den entsprechenden Substraten

Zunächst wurde angenommen, dass die Modifikation des Phenylrings der Zimtsäurederivate wie oben beschrieben auf der Stufe der freien Säuren geschieht (Chapple *et al.* 1994). Neuere Untersuchungen ergeben jedoch ein wesentlich komplexeres Bild (Humphreys *et al.* 1999; Dixon *et al.* 2001; Humphreys und Chapple 2002). So wurde eine Kaffeeoyl-CoA-3-O-Methyltransferase (CCoAOMT) identifiziert, deren reduzierte Aktivität in transgenen Tabakpflanzen zu verminderter Ligninproduktion mit nur geringen Anteilen an Coniferyl- und Syringyl-Monomeren führte (Humphreys und Chapple 2002). Eine weitere COMT aus dem Amberbaum methoxyliert Coniferylaldehyd mit deutlich höherer katalytischer Effizienz als die freie Ferulasäure (Osakabe *et al.* 1999). Auch die Ferulat-5-hydroxylase (F5H) aus *Arabidopsis* zeigte nach heterologer Expression einen etwa um den Faktor 1000 geringeren K_M -Wert für Coniferyl-Aldehyd und Coniferoyl-Alkohol im Vergleich zu Ferulasäure, was auf eine Bevorzugung dieser Substrate schließen lässt (Humphreys *et al.* 1999). Gleichzeitig wird vermutet, dass die Enzyme des Phenylpropanoidstoffwechsels in der Zelle als große Komplexe vorliegen, die über die P_{450} -abhängigen Hydroxylasen mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert sind (Winkel 2004). So könnte durch eine Veränderung der Komplexzusammensetzung ein direktes „channeling“ der Intermediate zu den jeweiligen Produkten stattfinden.

Acyladenylatbildende Enzyme

Die in dieser Arbeit untersuchte 4-Cumarat:CoA-Ligase katalysiert die Aktivierung von Hydroxyzimtsäuren und ist ein Mitglied der großen Gruppe der Acyladenylat bildenden Enzyme. Die Aktivierung von Carboxylsäuren ist essentiell für viele Abläufe im Metabolismus und sorgt für die Bereitstellung von Vorläufern für die Biosynthese oder den Abbau diverser Stoffwechselprodukte wie Lipiden, Aminosäuren, Zuckern und Sekundärmetaboliten. Die Acyladenylat bildenden Enzyme (synonym: Acyl aktivierende Enzyme (AAE) (Shockey *et al.* 2003)) führen eine charakteristische Zweischnittreaktion durch. Im ersten Schritt wird das Substrat nach Spaltung von ATP aktiviert und es entsteht das instabile Adenylyat-Zwischenprodukt, welches an das aktive Zentrum gebunden bleibt und für diese Gruppe von Enzymen namensgebend ist. Im zweiten Schritt erfolgt üblicherweise ein nucleophiler Angriff durch die freien Elektronen der Schwefelgruppe des Acyl-Akzeptors auf das Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe, so dass AMP freigesetzt und ein Thioester gebildet wird. (Siehe Abbildung 2)

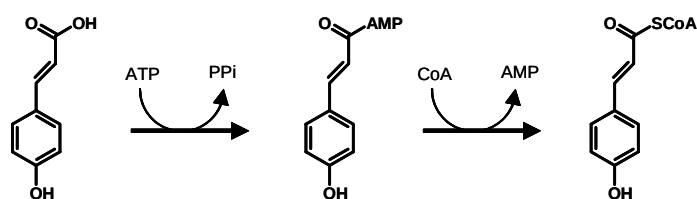


Abb. 2: Reaktionsmechanismus der Adenylyat bildenden Enzyme am Beispiel der Aktivierung von Cumarat

Im ersten Schritt wird das Cumarat-Adenylyat unter Verbrauch von ATP gebildet. Im zweiten Schritt erfolgt die Bildung des Thioesters unter Freisetzung von AMP.

Die meisten Organismen enthalten verschiedene Typen von Acyladenylyat bildenden Enzymen, die die Aktivierung von so verschiedenen Substraten wie Acetat und Fettsäuren jeder Kettenlänge (Watkins 1997), Benzoessäurederivaten (Chang *et al.* 1997), Zimtsäurederivaten (Ehlting *et al.* 1999), aber auch Citrat, Malat und Malonat (An *et al.* 1999) katalysieren. Dabei ist der häufigste Acyl-Akzeptor das Coenzym A, jedoch wurde auch eine Reihe von anderen Endakzeptoren beschrieben. Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen aus Bakterien beispielsweise aktivieren Aminosäuren für die Synthese von Antibiotika. In diesen Enzymkomplexen bilden spezifische Aktivierungsdomänen ein Aminosäure-Adenylyat und übertragen den Aminosäurerest auf die Thiogruppe einer enzymgebundenen 4-Phosphopantetheingruppe (Conti *et al.* 1997; May *et al.* 2002). Weitere Endakzeptoren sind Aminosäuren (Staswick und Tiriyaki 2004) oder molekularer Sauerstoff. Die Luziferase aus dem Glühwurm *Photinus pyralis* katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luziferin-AMP und produziert so das chemilumineszente Oxyluziferin (Conti *et al.* 1996).

Trotz der Vielfalt an Substraten und Produkten, sowie Unterschieden in der Größe der Proteine besitzen alle Acyladenylat bildenden Enzyme gemeinsame strukturelle Elemente (Abb. 3). Besonders essentiell für die Bindung des ATP und die Erzeugung des Acyl-AMPs ist ein stark konserviertes Motiv (PROSITE PS00455) mit der Konsensus-Sequenz [LIVMFY]-X-X-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-X-[PASLIVM]-[KR], das sogenannte AMP-Bindemotiv; für *Arabidopsis*-4CLs wurde auch der Begriff Box I verwendet (Conti *et al.* 1997; Stuible *et al.* 2000).

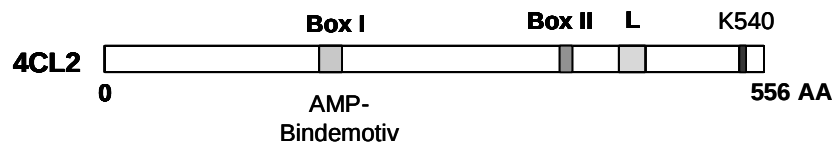


Abb. 3: Gemeinsame Struktur von Adenylat bildenden Enzymen am Beispiel von At4CL2

Den Adenylat bildenden Enzymen sind diverse Strukturelemente gemeinsam, so ein AMP-Bindemotiv (Box I für At4CLs), eine Domäne mit der Konsensus-Sequenz GEICIRG (Box II), ein Linkermotiv (DRLK[DE]L) zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne des Proteins (L) und ein an der Katalyse beteiligtes Lysin (K540).

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* sind 44 Enzyme codiert, die dieses Motiv besitzen, sowie weitere 19 mit einer leicht abgewandelten AMP-Bindedomäne, die eine zusätzliche Aminosäure zwischen Position neun und zehn enthält (Shockey *et al.* 2002; Shockey *et al.* 2003). Parallel zu den Untersuchungen in dieser Arbeit konnte die Funktion einiger Vertreter der Familie der Acyladenylat bildenden Enzyme identifiziert werden.

Die vier Cumarat:CoA-Ligasen (4CLs) sind wohl die am besten charakterisierte Gruppe aus dieser Familie. Die vier Isoenzyme At4CL1-4 wurden hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften, Expression und Evolution beschrieben (Lee *et al.* 1995a; Ehlting *et al.* 1999; Hamberger und Hahlbrock 2004). Außerdem wurden bereits erste Studien zur Substratspezifität dieser Enzyme unternommen (Ehlting *et al.* 2001; Stuible und Kombrink 2001). Diese Untersuchungen bilden eine Grundlage dieser Arbeit, daher wird in den folgenden Kapiteln noch genauer auf die Eigenschaften der 4CLs eingegangen.

Mittlerweile ebenfalls recht gut charakterisiert ist eine Gruppe von neun Enzymen, die die Aktivierung von langkettigen Fettsäuren katalysieren und als LACs (*long-chain acyl-CoA synthetases*) bezeichnet werden. LACS-Aktivität wurde bereits in diversen Kompartimenten der Zelle nachgewiesen, so in der äußeren Chloroplastenhülle, *Microbodies*, Ölkörpern in keimenden Samen und im Endoplasmatischen Reticulum (Schnurr *et al.* 2004). Sie konnte mit spezifischen Mitgliedern dieser Gruppe korreliert werden. So sind LACS6 und LACS7 peroxisomal lokalisiert und essentiell für die Samenkeimung (Fulda *et al.* 2002), LACS9 ist ein plastidäres Enzym und aktiviert Fettsäuren für den Export ins Cytosol (Schnurr *et al.*

2002) und für LACS2 wurde kürzlich eine Rolle in der Cutin-Biosynthese nachgewiesen und eine cytosolische Lokalisation vermutet (Schnurr *et al.* 2004).

Die oben genannte Gruppe von 19 Proteinen mit abweichendem AMP-Bindemotiv umfasst Enzyme, die die Phytohormone Indoleessigsäure und Jasmonsäure auf Aminosäuren übertragen. Mittlerweile gut charakterisiert ist JAR1, eine Jasmonat:Isoleucin-Ligase, die eine Rolle in der Weiterleitung von Jasmonsäure-Signalen spielt (Staswick *et al.* 1992; Staswick *et al.* 2002; Staswick und Tiriyaki 2004). Für sieben weitere Enzyme aus dieser Gruppe konnte die Aktivierung von Indoleessigsäure und verwandten Substraten mit unterschiedlichen Aminosäuren als Endakzeptoren gezeigt werden (Staswick *et al.* 2005). Obwohl die restlichen Proteine noch nicht charakterisiert wurden, scheint es sich bei dieser Unterfamilie nicht um CoA-Ligasen zu handeln. Eventuell ist die zusätzliche Aminosäure im AMP-Bindemotiv dieser Gruppe verantwortlich für die Übertragung auf Aminosäuren.

Eine große Zahl von Acyladenylat bildenden Enzymen aus *Arabidopsis thaliana* ist jedoch noch nicht charakterisiert. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Substratselektivität der 4-Cumarat:CoA-Ligasen sowie daran anschließend mit der Untersuchung der Substratselektivität von 4CL-ähnlichen Acyladenylat bildenden Enzymen.

Die 4-Cumarat:CoA-Ligase in *Arabidopsis thaliana*

Die 4-Cumarat:CoA-Ligase stellt durch ihre Position im Phenylpropanoidmetabolismus (siehe Kapitel 2) ein Bindeglied zwischen dem allgemeinen Teil dieses Stoffwechselweges und den Abzweigungen zu den unterschiedlichen Endprodukten dar. Es wurde daher vermutet, dass 4CLs eine Funktion in der Kanalisierung des Substratflusses (*channeling*) übernehmen. Wenn mehrere Isoformen von 4CL existieren, können diese Vorlieben für unterschiedliche Substrate besitzen und so für die Bereitstellung von spezifischen Zwischenprodukten für einzelne Zweige des Phenylpropanoidstoffwechsels sorgen. Tatsächlich enthalten viele Pflanzen mehrere 4CL-Isoformen, die sich bezüglich ihrer Substratspezifität oft kaum unterscheiden wie in Petersilie, Kartoffel oder Kiefer (Lozoja *et al.* 1988; Becker-Andre *et al.* 1991; Zhang und Chiang 1997), in manchen Spezies jedoch deutliche Unterschiede aufweisen wie in Soja und *Arabidopsis* (Ehlting *et al.* 1999; Lindermayr *et al.* 2002). Die bevorzugten Substrate sind Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure, während Sinapinsäure nur von wenigen 4CLs aktiviert wird.

In *Arabidopsis thaliana* besteht die Familie der 4CLs aus vier Isoformen. Zwei Vertreter (At4CL1 und At4CL2) sind in den Leitgeweben von Spross und Wurzel konstitutiv exprimiert. Ihre primäre Funktion liegt wahrscheinlich in Synthese von Lignin (Lee *et al.* 1995b; Ehlting *et al.* 1999). Dagegen konnte At4CL3 in unbehandelten Pflanzen nur mittels RT-PCR und hauptsächlich in den Blüten nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit UV-

Licht führte jedoch zu einer verstärkten Expression vor allem in den Blättern (Ehlting *et al.* 1999). Im Zeitraum dieser Arbeit konnte noch eine vierte 4CL-Isoform (At4CL4) aus *Arabidopsis* identifiziert werden, die wie 4CL1 und 4CL2 in den Leitbündeln exprimiert wird, allerdings in wesentlich geringerem Maße (Hamberger und Hahlbrock 2004). Abbildung 4 zeigt transgene *Arabidopsis*-Linien in denen das Gen für das Reporterenzym β -Glucuronidase (GUS) unter der Kontrolle der 4CL-Promotoren exprimiert wird.

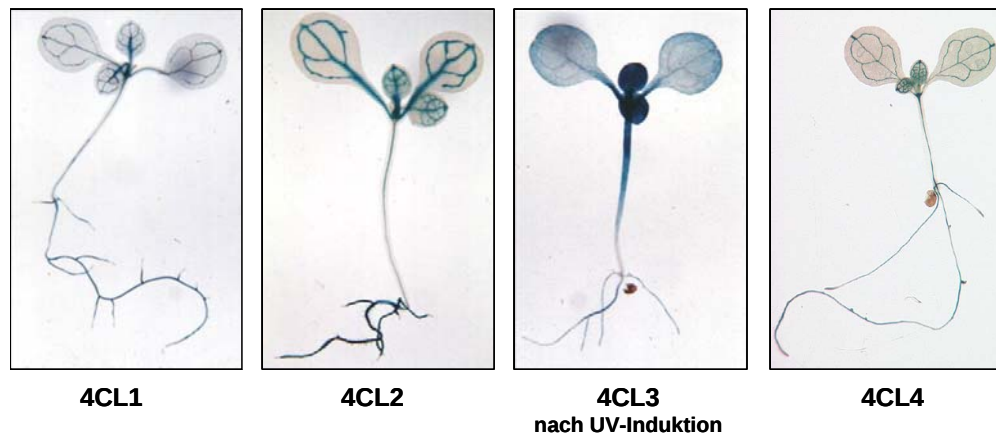


Abb. 4: Gewebespezifische Expression der 4CL-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana*
Promotorsequenzen der Gene *At4CL1*, *At4CL2*, *At4CL3* und *At4CL4* wurden an das GUS-Reporter gen fusioniert. Die Expression des Reportergens wurde nach Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen in Keimlingen der T1-Generation analysiert. Für *pAt4CL1*, *pAt4CL2* und *pAt4CL4* wurde die konstitutive Expression des Reportergens in den Leitgeweben durch X-Gluc-Färbung nachgewiesen. Für *pAt4CL3* ist eine GUS-Expression erst nach Behandlung mit UV-Licht zu beobachten.

Die biochemische *in vitro*-Charakterisierung der 4CL-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* zeigt, dass heterolog exprimierte At4CLs unterschiedliche Substratspektren aufweisen. Neben überlappenden Aktivitäten von At4CL1, At4CL2 und At4CL3 gegenüber Cumar- und Kaffeesäure zeigen At4CL2 und At4CL4 eine abweichende Spezifität. At4CL2 setzt im Gegensatz zu den anderen Isoformen Ferulasäure nur in sehr geringem Maße um und At4CL4 aktiviert als einzige At4CL-Isoform Sinapinsäure, eine wie bereits erwähnt seltene Eigenschaft von 4CLs. Zimtsäure wird von keiner der *Arabidopsis*-4CLs effizient umgesetzt.

Phylogenetische Analysen von 4CLs in Angiospermen und der Vergleich der Expressionsmuster ihrer Gene legen eine Unterteilung dieser Enzymfamilie in zwei Klassen nahe (Ehlting *et al.* 1999). Dabei scheinen Isoformen, die in Klasse II gruppiert werden wie At4CL3, den Metabolitfluss passend zu ihrer Expression in Blüten und der Epidermis in Richtung der Flavonoid-Synthese zu dirigieren, während Isoformen aus Klasse I (At4CL1, At4CL2 und At4CL4) eher die übrigen Zweige des Phenylpropanoidstoffwechsels in Richtung Lignin-Synthese bedienen, übereinstimmend mit ihrer Expression in Leitgeweben.

At4CL2 als Untersuchungsobjekt für die Substratspezifität von 4CLs

Aufgrund der zentralen Position von 4CL im Phenylpropanoidmetabolismus, die eine Beteiligung an diversen Stoffwechselvorgängen und Reaktionen der Pflanze auf äußere Einflüsse ermöglicht, stellen die 4-Cumarat:CoA-Ligasen ein interessantes Forschungsobjekt dar. Wesentliche Erkenntnisse über die Funktionsweise von At4CL2 als Vertreter dieser Enzymfamilie konnten bereits im Vorfeld dieser Arbeit gewonnen werden.

Aufgrund seiner im Vergleich zu den anderen Isoformen aus *Arabidopsis* höheren Stabilität nach heterologer Expression in *E. coli* wurde At4CL2 verwendet, um die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Aktivität von 4CL zu überprüfen (Stuible *et al.* 2000). At4CLs enthalten neben dem AMP-Bindemotiv (hier Box I genannt) eine weitere komplett konservierte Domäne mit der Sequenz GEICIRG (Box II), die auch in anderen Adenylat bildenden Enzymen vorhanden ist. Zunächst wurde dem zentralen Cystein in Box II eine direkte Beteiligung an der Katalyse zugeschrieben (Becker-Andre *et al.* 1991), der gezielte Austausch dieser Aminosäure in At4CL2 führte jedoch nicht zur Inaktivität des Enzyms (Stuible *et al.* 2000). Dagegen konnte für diverse unter den Adenylat bildenden Enzymen stark konservierte Aminosäuren (Lys211, Lys457 und Arg449) ein wesentlicher Anteil an der Enzymaktivität von 4CL2 nachgewiesen werden sowie die Beteiligung des Restes Lys540 an der Katalyse. Die Bedeutung dieses Lysins wurde bereits für die Phenylalanin aktivierende Domäne (PheA) der Gramicidin-S-Synthetase aus *Bacillus brevis* nachgewiesen (Conti *et al.* 1997). Die Kristallstruktur von PheA zeigt, dass das entsprechende Lysin in diesem Acyladenylat bildenden Enzym sowohl mit der Carboxygruppe des Substrats als auch mit der Phosphatgruppe des AMP interagiert und so den Übergangszustand während der Adenylatbildung stabilisiert. Diese Übereinstimmungen in der Bedeutung einzelner Aminosäuren bestätigten experimentell die Zugehörigkeit der 4CLs zu den Adenylat bildenden Enzymen.

Zusätzlich zu diesen die Aktivität von 4CL betreffenden Aminosäuren konnten im Vorfeld dieser Arbeit bereits Reste identifiziert werden, die die Substratspezifität dieses Enzyms bestimmen (Stuible und Kombrink 2001). Wie bereits beschrieben haben die 4CL-Isoformen aus *Arabidopsis* deutlich unterschiedliche Substratspektren. Die spezielle Eigenschaft von 4CL2, Kaffeesäure (3-OH-Gruppe) umzusetzen, Ferulasäure (3-OCH₃-Gruppe) hingegen kaum, erlaubt die Herstellung von *gain-of-function*-Mutanten, so dass die Bedeutung von spezifischen Aminosäuren für den Umsatz eines bestimmten Substrats untersucht werden kann. Durch den Austausch von Proteinabschnitten (*domain swaps*) zwischen At4CL1 und At4CL2 konnte gezeigt werden, dass die für die Aktivierung von Ferulasäure relevanten Aminosäuren zwischen Box I und Box II lokalisiert sind (Ehlting *et al.* 2001). Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der 4CLs mit der von PheA ermöglichte die Vorhersage von neun Resten in diesem Bereich, die zusätzlich zum katalytischen Lysin an der Bildung der