Klonierung von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen aus *Ammi majus* L. und funktionelle Expression der Zimtsäure 4-Hydroxylase

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Silvia Specker
aus
Venedig (Italien)

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am 14.1.2004.
Erstgutachter: Prof. Dr. U. Matern
Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer
Tag der mündlichen Prüfung: 14.1.2004

Wesentliche Auszüge dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hübner, S. , Hehmann, M., Schreiner, S., Lukačin, R. , Matern, U., 2003. Functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from *Ammi majus* L. *Phytochemistry* **64**, 445-452.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1 Die Furanocumarine 1
1.1.1 Chemie der Furanocumarine 1
1.1.2 Vorkommen 2
1.1.3 Bedeutung für die Pflanze – Grundlagen induzierter pflanzlicher Pathogenabwehr 2
1.1.4 Reaktionen von *Petroselinum crispum* nach Infektion mit *Phytophthora sojae* 6
1.1.5 Bioaktivitäten der linearen Furanocumarine 7
1.1.6 Anwendung der Furanocumarine in Medizin und Forschung 10
1.1.7 Interaktion zwischen Furanocumarinen und Insekten 11

1.2 Die Biosynthese der linearen Furanocumarine 12
1.2.1 Der generelle Phenylpropanweg 12
1.2.1.1 Wichtige Schritte der Phenylpropanbiosynthese 12
1.2.2 Die Biosynthese des Umbelliferons 13
1.2.3 Die Prenylierung des Umbelliferons 14
1.2.4 Die Bildung von Marmesin 16
1.2.5 Die Psoralensynthase 17
1.2.6 Produkte aus Psoralen 18
1.2.7 Induzierbarkeit der Furanocumarinbiosynthese 21

1.3 *Ammi majus* L. - Inhaltsstoffe und Bedeutung 21

1.4 Cytochrom P450 Enzyme 23
1.4.1 Einteilung und Nomenklatur 24
1.4.2 Der Reaktionszyklus der Cyt P450 25
1.4.3 Die Struktur eukaryotischer Cyt P450 27
1.4.4 Cyt P450 in Pflanzen 30
1.4.5 Die Bedeutung der Cyt P450 für den Menschen 31
1.4.6 Die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase 32
1.4.7 „Mechanism-based enzyme inactivation" von Cyt P450 33

1.5 Die Zimtsäure 4-Hydroxylase 34

1.6 Regulation der Enzyme des Phenylpropanwegs 35

1.7 Zielsetzung der Arbeit 37

2. MATERIAL UND METHODEN 39

2.1 Material 39
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 39
2.1.2 Radiochemikalien 40
2.1.3 Substrate und Kosubstrate 40
2.1.4 Enzyme 40
2.1.5 Reaktionssysteme und Kits 40
2.1.6 Bakterien- und Hefestämme 41
2.1.6.1 *E.coli* 41
2.1.6.2 Hefe 41
2.1.7 Vektoren 42
2.1.7.1 *E. coli*-Vektoren 42
2.1.7.2 Hefeexpressionsvektoren 42
2.1.8 Puffer und sonstige Lösungen 43

2.1.9 Medien 46
2.1.9.1 Bakterienmedien 46
2.1.9.2 Hefemedien 46
2.1.9.3 Zellkulturmedien 46
2.1.10 Dünnschichtplatten und Laufmittel 47
2.1.11 Geräte 47

2.2 Methoden 48
2.2.1 Gewinnung des Pflanzenmaterials 48
2.2.1.1 Anzucht der Zellen 48
2.2.1.2 Induktion mit Elicitoren 48
2.2.1.3 Ernte 48
2.2.2 Molekularbiologische Methoden 48
2.2.2.1 RNA-Isolierung 48
2.2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA (Methode A) 48
2.2.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA nach Giuliano (Methode B) 48
2.2.2.1.3 Isolierung von poly(A)$^+$-RNA 49
2.2.2.2 Reverse Transkription 49
2.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 50
2.2.2.3.1 Synthese von Oligonukleotiden 50
2.2.2.3.2 Standard PCR 50
2.2.2.3.3 Cyt P450 spezifisches Differential Display (DD-RT-PCR) 50
2.2.2.3.4 Cytochrom P450 spezifische PCR nach Fischer *et al*. (2001) 51
2.2.2.3.5 PCR zur Amplifizierung der cDNA der CPR 53
2.2.2.4 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 54
2.2.2.4.1 3'-RACE 54
2.2.2.4.2 5'-RACE mit A- und C-Tailing 54
2.2.2.4.3 RLM-RACE 55
2.2.2.4.4 Mutagenese-PCR 57
2.2.2.5 Präparation von DNA 58
2.2.2.5.1 Präparation von Plasmid DNA 58
2.2.2.5.1.1 Methode A 58
2.2.2.5.1.2 Methode B 59
2.2.2.5.2 Isolierung von genomischer DNA 59
2.2.2.6 DNA-Sequenzanalyse 59
2.2.2.7 Northern Hybridisierung (Dot Blot) 59
2.2.2.7.1 Radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten 59
2.2.2.7.2 Blotting 60
2.2.2.7.3 Hybridisierung 60
2.2.2.8 Expression in Hefe 60
2.2.2.8.1 Klonierung in den Hefeexpressionsvektor pYeDP60 60
2.2.2.8.2 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* 60
2.2.2.8.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* 60
2.2.2.8.4 Induktion von transformierten *Saccharomyces cerevisiae* 61
2.2.2.8.5 Isolierung der Hefemikrosomen 61
2.2.3 Biochemische Methoden 61
2.2.3.1 Test auf C4H-Aktivität 61
2.2.3.2 Test auf Marmesinsynthase-Aktivität 61
2.2.3.3 Test auf C3H-Aktivität 62
2.2.3.3.1 4-Cumarsäure 62
2.2.3.3.2 Umsatz von Cumarsäuremethylester 62
2.2.3.4 Proteinbestimmung 62
2.2.3.5 Nachweis der Aktivität der CPR in Hefemikrosomen 62
2.2.4 Sonstiges 63
2.2.4.1 Radioaktivitätsmessungen 63

3. ERGEBNISSE 64

3.1 Induktion der Furanocumarinbiosynthese 64

3.2 Isolierung von CYP-spezifischen cDNA-Fragmenten 65

3.3 Generierung der fünf vollständigen cDNA-Klone 70
3.3.1 *Am*CYP73A41 70
3.3.2 *Am*CYP71AJ1, *Am*CYP98A21, *Am*CYP76B8, *Am*CYP82H1 72

3.4 Sequenz- und Datenbankanalyse zur Identifizierung der isolierten cDNAs 74
3.4.1 *Am*CYP73A41 (Zimtsäure 4-Hydroxylase) 74
3.4.2 *Am*CYP71AJ1 78
3.4.3 *Am*CYP98A21 82
3.4.4 *Am*CYP76B8 85
3.4.5 *Am*CYP82H1 88

3.5 Northern Blot Analyse 91
3.5.1 *Am*CYP73A41 (Zimtsäure 4-Hydroxylase) 91
3.5.2 *Am*CYP71AJ1 92
3.5.3 *Am*CYP98A21 94
3.5.4 *Am*CYP76B8 94
3.5.5 *Am*CYP82H1 95

3.6 Heterologe Expression und Funktionsanalyse der isolierten Klone 95
3.6.1 *Am*CYP73A41(Zimtsäure 4-Hydroxylase) 95
3.6.1.1 Biochemische Charakterisierung der C4H 97
3.6.1.1.1 pH-Abhängigkeit 97
3.6.1.1.2 Temperaturabhängigkeit 98
3.6.1.1.3 Kinetische Konstanten der C4H 98
3.6.1.1.3.1 Protein- und Zeitlinearität 98
3.6.1.1.3.2 Michaelis-Menten Konstanten 99
3.6.1.1.4 Untersuchung der Hemmung durch Psoralene 101
3.6.2 *Am*CYP71AJ1 102
3.6.3 *Am*CYP98A21, *Am*CYP76B8 und *Am*CYP82H1 103

3.7 NADPH-Cytochrom P450 Reduktase 104
3.7.1 cDNA-Klonierung 104
3.7.2 Sequenzanalyse 106
3.7.3 Expression und Funktionsanalyse 111

4. DISKUSSION 112

4.1 Strategien zum Klonieren von Cyt P450 aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanze 112

4.2 Klonierung von Cyt P450 aus *Ammi majus* L. 114

4.3 Expression in Hefe und Klonierung der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase 116

4.4 Sequenz 1 - Zimtsäure 4-Hydroxylase 118

4.5 Sequenz 2 (*Am*CYP71AJ1) 122

4.6 Sequenz 3 (*Am*CYP98A21) 127

4.7 Sequenz 4 (*Am*CYP76B8) 131

4.8 Sequenz 5 (*Am*CYP82H1) 132

4.9 Evolutionäre Aspekte 133

4.10 Die Bedeutung der Furanocumarine in Nahrungsmitteln 136

4.11 Ausblick 137

5. ZUSAMMENFASSUNG 139

6. LITERATURVERZEICHNIS 141

7. ANHANG 161

7.1 Übersicht der verwendeten Primer 161

7.2 Sequenzvergleich CYP73 163

7.3 Datenbank-Nummern und Referenzen 167

7.4 Codes der Aminosäuren 168

7.5 Internetadressen 168

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Grundgerüst der linearen (1) und angulären (2) Furanocumarine 1
Abb. 2: Signaltransduktion in *Arabidopsis* nach Behandlung mit Flagellin 5
Abb. 3: Angenommenes Modell der Signaltransduktion der induzierten Abwehr in *Petroselinum crispum* 7
Abb. 4: Photocycloaddukte der Furanocumarine mit Thymin oder Cytosin 8
Abb. 5: Der allgemeine Phenylpropanweg 13
Abb. 6: Vorgeschlagene Wege der Bildung des Umbelliferons 14
Abb. 7: Prenylierung des Umbelliferons 15
Abb. 8: Bildung des DMAPP über den MEP-Weg 15
Abb. 9: Hypothetischer Mechanismus der Bildung von (+)-Marmesin aus DMS 17
Abb. 10: Bildung von Psoralen aus (+)-Marmesin 18
Abb. 11: Biosynthese der linearen Furanocumarine 20
Abb. 12: *Ammi majus* L. 21
Abb. 13: Ausgewählte Inhaltsstoffe von *Ammi majus* L. 22
Abb. 14: Häm Typ b 23
Abb. 15: Anordnung der Reduktase, des Cyt b5 und des Cyt P450 an der Membran des ER 25
Abb. 16: Katalytischer Reaktionszyklus der Cyt P450 26
Abb. 17: Sekundär- und Tertiärstruktur 28
Abb. 18: Schematische Darstellung der Struktur von membranständigen Cyt P450 29
Abb. 19: Piperonylsäure 34
Abb. 20: *E. coli*-Vektoren: pCR2.1-TOPO (Invitrogen) und pCR4-TOPO (Invitrogen) 42
Abb. 21: Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) 42
Abb. 22: Hefeexpressionsvektor pYeDP60 43
Abb. 23: Amplifizierte Fragmente in der 1. und 2. PCR nach Fischer *et al.*, 2001 52
Abb. 24: Übersicht des 5'-RACE mit C-Tailing 55
Abb. 25: Übersicht des RLM-RACE 57
Abb. 26: Cyt P450 spezifische DD-RT-PCR mit dem Decamer 7 und Oligo C 66
Abb. 27: Lage des [PERF]-Motivs und des [PFG]-Motivs 67
Abb. 28: Schema der PCR-Methode nach Fischer *et al.* (2001) 68
Abb. 29: Auftrennung im Agarosegel von amplifizierten P450-Fragmenten 69
Abb. 30: Amplifizierte PCR-Fragmente 71
Abb. 31: Amplifizierte PCR-Fragmente und verwendete Primer im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP71AJ1, *Am*CYP98A21, *Am*CYP76B8, *Am*CYP82H1 72
Abb. 32: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz der C4H (CYP73A41, AY219918) aus *Ammi majus* L. 76
Abb. 33: Sequenzvergleich von *Ammi majus* CYP73A41 und *Petroselinum crispum* CYP73A10 77
Abb. 34: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz von CYP71AJ1 aus *Ammi majus* L. 80
Abb. 35: Sequenzvergleich der *Mentha piperita* Menthofuransynthase (MFS) aus *Mentha* x *piperita* mit *Am*CYP71AJ1 81

Abb. 36: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz von CYP98A21 aus *Ammi majus* L. 83
Abb. 37: Sequenzvergleiche der C3Hs aus *Ocimum basilicum*, *Pinus taeda* und *Sesamum indicum* mit CYP98A21 aus *Ammi majus* 85
Abb. 38: Nukleotidesequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Poylpeptidsequenz von CYP76B8 aus *Ammi majus* L. 87
Abb. 39: Vergleich der G10H aus *Catharanthus roseus* (Q8VWZ7, C. r.) mit *Am*CYP76B8 (A. m.) 88
Abb. 40: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz CYP82H1 aus *Ammi majus* L. 90
Abb. 41: Relative Transkriptmenge der CYP73A41 nach Elicitor-Induktion von *Ammi majus* Zellen 92
Abb. 42: Induktion der relativen Transkriptmenge von CYP71AJ1 in *Ammi majus* Zellen nach Zugabe von Elicitor 92
Abb. 43: Northern Dot Blot von *Am*CYP71AJ1 93
Abb. 44: Relative 25S rRNA Transkriptmenge zur Standardisierung des o.a. Dot Blots 93
Abb. 45: Relative Transkriptmenge der *Am*CYP98A21 nach Induktion in *Ammi majus* Zellen 94
Abb. 46: Enzymtest C4H 96
Abb. 47: pH-Abhängigkeit der C4H 98
Abb. 48: C4H-Abhängigkeit von der Proteinmenge 99
Abb. 49: Abhängigkeit des C4H-Umsatzes von der Zeit 99
Abb. 50: Graphische Ableitung der apparenten K_m für Zimtsäure nach doppelt reziproker Auftragung entsprechend Lineweaver-Burk 100
Abb. 51: Graphische Ableitung der apparenten K_m für NADPH nach doppelt reziproker Auftragung entsprechend Lineweaver-Burk 101
Abb. 52: Amplifizierte Fragmente der CPR aus *Ammi majus* 105
Abb. 53: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz der NADPH-Cytochrome P450 Reduktase (CPR) aus *Ammi majus* L. 108
Abb. 54: Sequenzvergleich der NADPH cytochrome P450 Reduktasen 110
Abb. 55: Lage der konservierten Motive in *Am*CYP73A41 119
Abb. 56: Effekte auf die Biosynthesewege durch der Hemmung der C4H 122
Abb. 57: Enzymaktivitäten der O-Prenyltransferase (▲), der Marmesinsynthase (■) und der Psoralensynthase (○) 124
Abb. 58: Bildung von (+)-Menthofuran durch die MFS 125
Abb. 59: Hypothetisher Mechanismus a) der Marmesinsynthase 125
Abb. 60: hypothetischer Mechanismus b) der Bildung von Marmesin 126
Abb. 61: Veränderungen der *p*-Cumarsäure 129
Abb. 62: Cumarine 130
Abb. 63: Bedeutung der G10H in der Alkaloidbiosynthese 132
Abb. 64: Biosynthese der angulären Furanocumarine 135
Abb. 65: Vergleich der Konfigurationen von (+)-Marmesin und (+)-Columbianetin 136

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ausgewählte Beispiele von durch Cyt P450 metabolisierten Arzneistoffen 31
Tab. 2: Primerkombinationen der 2. PCR nach Fischer *et al.*, 2001 52
Tab. 3: Vergleich der eingesetzten Primer und der isolierten ESTs 69
Tab. 4: Verwendete Primer im Verlauf der Klonierung der C4H 72
Tab. 5: Amplifizierte PCR-Fragmente und verwendete Primer im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP71AJ1 73
Tab. 6: Amplifizierte PCR-Fragmente im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP98A21 73
Tab. 7: Amplifizierte PCR-Fragmente und verwendete Primer im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP76B8 73
Tab. 8: Amplifizierte PCR-Fragmente und verwendete Primer im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP82H1 74
Tab. 9: Relative Hemmung der C4H-Aktivität durch Psoralen oder 8-MOP 102
Tab. 10: Vergleich der Codons von *Ammi majus* und Hefe 117
Tab. 11: Induktion der Enzyme der Furanocumarinbiosynthese 124

1. Einleitung

Pflanzen bilden eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten, von denen viele aus dem Phenylpropanstoffwechsel stammen. Dazu zählen Flavonoide und Stilbene (Harborne und Williams, 2000; Hain *et al*., 1993), die bereits gut erforscht sind, aber auch Lignane sind zurzeit Gegenstand vieler Untersuchungen (Anterola *et al*., 2002; Douglas, 1996). Lücken existieren jedoch noch auf dem Gebiet der Catechine und Cumarine, obwohl aus Einbaustudien der prinzipielle Biosyntheseweg bekannt ist. Diese Arbeit ist den Cumarinen und hier besonders den Furanocumarinen gewidmet, da Kenntnisse ihrer Biosynthese für den Menschen von landwirtschaftlichem Interesse wären. Ziel wäre regulierend auf die Biosynthese eingreifen zu können, da das phototoxische Potential und die Carzinogenität der Furanocumarine zum Beispiel bei Sellerie schwere Folgen für den Menschen haben.

Psoralene (lineare Furanocumarine) zählen zu den ältesten bekannten natürlichen Produkten in der Medizin und sind auch heute noch im Gebrauch. So wurden Psoralen-haltige Pflanzen laut ägyptischer, indischer und chinesischer Literatur schon 2000 vor Christus bei Hauterkrankungen eingesetzt (Pathak und Fitzpatrick, 1992). In Ägypten zählte die Psoralenhaltige Pflanze *Ammi majus* (Apiaceae) zu einer der wichtigsten Pflanzen in der Medizin (Elgamal *et al*., 1993; Nasser und Singab, 1998) und dient dort heute vor allem zur industriellen Gewinnung von Xanthotoxin, das in der Therapie von Vitiligo eingesetzt wird. Die wohl bekannteste Anwendung der Psoralene ist die PUVA-Therapie bei Psoriasis, Vitiligo und T-Zell-Lymphomen.

1.1 Die Furanocumarine

1.1.1 Chemie der Furanocumarine

Furanocumarine sind planare, tricyclische Substanzen, die aus einen Cumarinteil und einem annellierten Furanring aufgebaut sind. Man unterteilt sie in zwei Hauptstrukturtypen, die Furanocumarine vom linearen und angulären Typ. Bei den linearen Furanocumarinen ist der Furanring über Position 6 und 7 an das Benz-2-pyron Gerüst gebunden und bei den Furanocumarinen vom angulärem Typ ist der Furanring über Position 7 und 8 annelliert.

(1) (2)

Abb. 1: Grundgerüst der linearen (1) und angulären (2) Furanocumarine

Aufgrund ihrer aromatischen Struktur absorbieren Furanocumarine Licht besonders im UVB-Bereich (250-300 nm) und gehen dadurch in einen angeregten Singulett- oder Triplettzustand über. Die einzelnen Verbindungen weisen spezifische UV-Spektren auf.

1.1.2 Vorkommen

Bis heute sind über 200 Furanocumarine beschrieben worden, die man in die linearen und angulären Furanocumarinen einteilt (Pathak et al, 1962). Anguläre Furanocumarine treten nur in wenigen Familien wie den Apiaceae, Rutaceae und Fabaceae auf (Murray *et al*., 1982). Lineare Furanocumarine kommen unter anderem in der Familie der Apiaceae (zum Beispiel *Ammi majus* L., *Petroselinum crispum, Apium graveolens*, *Pastinaca sativa; Prangos pabularia*, Tada *et al*., 2002; *Glehnia littoralis*, Kitamura *et al*., 1998; *Pituranthos tortuosus*, Abdel-Kader, 2003), der Rutaceae (zum Beispiel *Ruta graveolens* L., *Citrus bergamia*; Gellert *et al*., 1972; *Tetradium daniellii*, Stevenson *et al*., 2003), der Moraceae (zum Beispiel *Ficus carica; Dorstenia gigas*, Franke *et al*., 2001; *Brosimum gaudichaudii*, Monteiro *et al*., 2002), der Fabaceae (Psoralea- und Coronilla-Arten; Pathak *et al*., 1962) und der Rubiaceae (*Mitacarpus scaber*, Bisignano *et al*., 2000) vor. Besonders reich an Furanocumarinen sind die Familien der Rutaceae und Apiaceae, wobei Furanocumarine aus über 55 Gattungen der Apiaceae beschrieben worden sind.

Furanocumarine kommen in allen ober- und unterirdischen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Da die Furanocumarinproduktion auf Kosten des Wachstums erfolgt, ist die Konzentration in den Sämlingen geringer (Lohman und McConnaughay, 1998). Allgemein ist die Konzentration in reifen Pflanzen (Lohman und McConnaughay, 1998) und den Früchten höher. In Sellerie wurde die höchste Konzentration an den äußeren Blättern gemessen (Diawara *et al*., 1995). Weil Furanocumarine toxisch sind und der Pflanze zur Abwehr dienen, wird der größte Teil aus der Pflanzenzelle auf die Blattoberfläche ausgeschieden (Tietjen *et al*., 1983). Auch auf den Früchten werden Furanocumarine abgelagert (Zobel und March, 1993), wobei die Ausscheidung vermutlich über Vesikel des ER geschieht.

1.1.3 Bedeutung für die Pflanze – Grundlagen induzierter pflanzlicher Pathogenabwehr

Die Bedeutung von Sekundärmetaboliten ist generell unklar. Sie sind für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze entbehrlich und haben meist keine allgemeine Verbreitung (Dixon 2001). Nach der heute akzeptierten Definition haben sie ihre Bedeutung als

Mediatoren bei der Interaktion mit der Umwelt (Ober und Hartmann, 2000). In diesem Sinne können viele Sekundärmetabolite mit antimikrobiellen Eigenschaften als Abwehrstoffe klassifiziert werden. Daher ist es notwendig im Zusammmenhang mit den antimikrobiell wirksamen Furanocumarinen, die Grundlagen der induzierten pflanzlichen Pathogenabwehr kurz zu charakterisieren. Die Abwehrmechanismen der Pflanze bestehen aus einer Vielzahl von Einzelreaktionen, deren Abläufe und Zusammenhänge noch nicht vollständig verstanden sind. Neben der induzierten Abwehr gibt es ebenfalls präformierte Schutzmechanismen, auf die jedoch nicht näher eingegangen wird.

Niedermolekulare, antimikrobiell wirksame Stoffe, die wie die Furanocumarine von Pflanzen zur Abwehr von Pathogenen gebildet werden, bezeichnet man als Phytoalexine (Paxton, 1980). Solche Phytoalexine gehören zu den verschiedensten Stoffklassen. So bilden Pflanzen der Familie der Solanaceae und Malvaceae Sesquiterpene als wachstumshemmende Stoffe und Leguminosen Isoflavonoide oder Polyacetylene. Häufig zitiert werden auch das Pisatin aus *Pisum sativum* (Perrin und Bottomley, 1961) und das Resveratrol aus *Vitis vinifera* (Hain *et al.*, 1993).

Alle biotischen und abiotischen Faktoren, die die Phytoalexinbildung auslösen, werden als Elicitoren bezeichnet. Biotische Elicitoren sind in der Regel Zellwandbestandteile des Pathogens. Dies können Peptide oder Polysaccharide sein. Bei dem Pilz *Phytophthora sojae* (früher *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, *Pmg*) wirkt in *Petroselinum crispum* zum Beispiel ein Peptid aus der Zellwand als Elicitor und induziert so die Furanocumarinbildung. Es hat sich gezeigt, dass eine Sequenz von 13 Aminosäuren aus diesem Glycoprotein ausreicht, um die volle Pflanzenabwehr zu stimulieren (Hahlbrock *et al.*, 1995). In Zellkulturen der Sojabohne rufen Glucane die Phytoalexinbildung hervor (Sharp *et al.*, 1984). Neuere Forschungen befassen sich mit der genauen Untersuchung der als Elicitor wirksamen Strukturen aus *Phytophthora sojae* (Qutob *et al.*, 2003).

Nach Infektion mit dem Pathogen beginnt die induzierte Abwehr. Das setzt voraus, dass die Pflanzen das Pathogen erkennen, was meist rezeptorvermittelt erfolgt. Als Erkennungsstrukturen wirken oft Zellwandbestandteile des Pathogens, die Elicitoren. Die dann einsetzenden induzierten Abwehrmechanismen können lokal und systemisch ablaufen. In der inkompatiblen Interaktion reagiert die Pflanze zuerst lokal am betroffenen Gewebe mit einer Überempfindlichkeitsreaktion (hypersensitive response, HR). Sie soll das Wachstum und die Ausbreitung des Pathogens verhindern und führt zu Nekrose und Absterben des infizierten Gewebes. Hierbei sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt. Die benachbarten Zellen sezernieren antimikrobielle Metabolite (Phytoalexine) in das tote,

befallene Areal. Gleichzeitig werden als physikalische Barriere die Zellwände benachbarter Zellen durch gesteigerte Synthese von Zellwandpolymeren verstärkt (Hahlbrock *et al.*, 1995). Ebenfalls induziert wird die Bildung von PR-Proteinen (pathogenesis related), wozu lytische Enzyme wie die β-1,3-Glucanasen, die Proteasen und die Chitinasen zählen. Diese Enzyme akkumulieren in der Vakuole und können die Zellwände der Pathogene abbauen.

Nach Stunden oder Tagen entwickelt die Pflanze die systemische Resistenz (systemic acquired resistance, SAR). Sie schützt die ganze Pflanze vor einem erneuten Befall mit dem gleichen oder ähnlichen Pathogen und ist daher von der lokal wirkenden LAR (local acquired resistance) abzugrenzen. Auslöser der SAR sind unter anderem die in der HR gebildeten Sauerstoffspezies (Chen *et al.*, 1993). Die Phytoalexinbildung dagegen soll nach Rustérucci *et al.* (1996) unabhängig von reaktiven Sauerstoffspezies und Nekrose ablaufen.

Die genauen Mechanismen der Auslösung und Signaltransduktion der verschiedenen Abwehrreaktionen sind sehr komplex und noch nicht vollständig bekannt. Nach der rezeptorvermittelten Erkennung der Elicitoren an der Zelloberfläche, erfolgt die Weiterleitung der Signale durch ein System aus vielen Komponenten (Bolwell *et al.*, 1991). Als wichtigste Komponente sind hier die Proteinkinasen zu nennen. Es ist bekannt, dass die intrazelluläre Signalweiterleitung nach Elicitierung, Berührung, Kälteeinfluss oder Verwundung über Phosphorylierungen von Proteinen durch Proteinkinasen erfolgt (Cardinale *et al.*, 2000), wobei schon mehrere verschiedene Kaskaden von Proteinkinasen entdeckt worden sind. In diesem Zusammenhang sind besonders die Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs; Allwood *et al.*, 2002) und die MAP-Kinasen (MAPKs; Ligterinck *et al.*, 1997) zu nennen. In Tieren und Hefen sind die Substrate von stressaktivierten MAPKs meist Transkriptionsfaktoren. Es wird postuliert, dass dies bei Pflanzen ebenfalls der Fall ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch ein Forschungsergebnis von Ligterinck *et al.* (1997), die an Petersielienzellen zeigten, dass nach Elicitierung eine Translokation einer MAPK in den Kern erfolgt.

Anschließend findet auf transkriptioneller Ebene eine Aktivierung der Abwehrgenexpression statt. Von der PAL-Induktion (Phenylalanin Ammoniak-Lyase) ist bekannt, dass eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erfolgt, die an definierten *cis*-Elementen (GCC-, W-, G-Boxen) die Transkription des Gens modulieren (Hahlbrock *et al.*, 1995). Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren kann durch Phosphorylierungen erfolgen. Solche Transkriptionsfaktoren sind zum Beispiel die Myb-Proteine, die von einer großen Genfamilie gebildet werden. Diese Myb-Gene sind Homologe zu den Myb-Oncogenen in Tieren und bereits aus verschiedenen Pflanzen isoliert worden. Sie regulieren hier nicht nur

die SAR, sondern auch die Biosynthese von Sekundärstoffen wie Flavonoiden und anderen Phenylpropanoiden. Aus Tabak ist ein durch Tabak-Mosaik-Virus (TMV) induzierbares *myb*-Gen bekannt, dass vermutlich in der durch Salicylsäure (SA) vermittelten Pflanzenabwehr eine Rolle spielt (Yang und Klessig, 1996). Salicylsäure kommt endogen in der Pflanze vor und spielt unter anderem eine regulatorische Rolle in der Pflanzenabwehr (Durner *et al*., 1997).

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass weiterhin DNA-bindende Proteine („DNA-binding proteins"), die die WRKY-Domäne enthalten, an der transkriptionellen Regulation der Abwehrgene beteiligt sind. Sie binden ebenfalls spezifisch an die W- und GCC-Boxen der Promotoren der Abwehrgene und können durch Salicylsäure und Pathogene induziert werden (Du und Chen, 2000). Aus *Petroselinum crispum* ist zum Beispiel ein DNA-bindendes Protein bekannt, das das pathogenresponsive Element des *PR-1*-Gens erkennt und so die Expression dieses PR-Proteins reguliert (Rushton *et al*., 1996).

Asai *et al.* (2002) haben vor kurzem eine komplette MAPK-Kaskade und WRKY-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* aufgeklärt, die die oben genannten Komponenten der Signalkaskade zusammenfügt. Es hat sich gezeigt, dass die Signalwege partiell analog zu den Signalwegen der angeborenen Immunantwort in Insekten und Säugetieren verlaufen. *Arabidopsis*-Zellen erkennen das bakterielle Pathogen Flagellin über einen Rezeptor (FLS2), der den Toll-like-Rezeptoren (TLRs) der tierischen Immunantwort ähnelt. Das Signal wird dann über die FLS2-Kinase und eine Reihe von MAP-Kinasen bis zu einem WRKY-Transkriptionsfakor weitergeleitet, der wiederum die Gentranskription bestimmter Gene beeinflusst und so zu Resistenz führt.

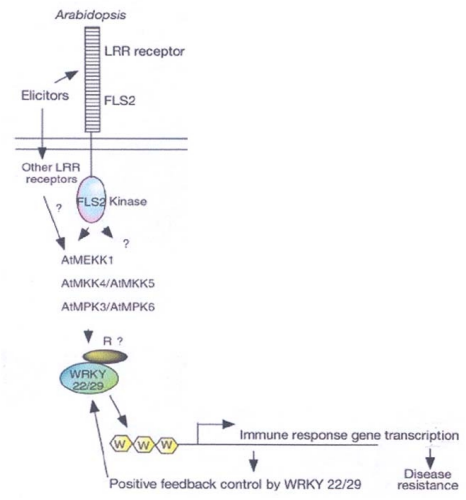


Abb. 2: Signaltransduktion in *Arabidopsis* nach Behandlung mit Flagellin
(entnommen aus Asai *et al*., 2002)

Weitere wichtige Komponenten in Signalkaskaden der pflanzlichen Abwehr sind Salicylsäure, Jasmonat und Ethylen (Thomma *et al.*, 2001). Jasmonat und Ethylen spielen als Signalmoleküle eine große Rolle in der von Salicylsäure unabhängigen Abwehr (Pieterse und van Loon, 1999). In der von Salicylsäure abhängigen Abwehr akkumuliert Salicylsäure im Laufe der HR (hypersensitive response) und der SAR, sie kann die SAR aber auch gleichzeitig induzieren (Ryals *et al*., 1995). Durch Pathogene induzierte Salicylsäure ist zuerst in Gurke (*Cucumis sativus* L.) nachgewiesen worden (Métraux *et al*., 1990). Zum Beweis der Bedeutung wurden später Propfversuche mit transgenem Tabak, der das Gen *nahG* von *Pseudomonas putida* trägt, das zum Abbau von Salicylsäure führt, durchgeführt. Diese Pflanzen können keine SAR mehr ausbilden (Ryals *et al.*, 1995). Salicylsäure spielt unter anderem eine Schlüsselrolle in der Genaktivierung der PR-Proteine. Wie die Aktivierung genau erfolgt, ist noch nicht geklärt. Versuche mit transgenen Pflanzen haben gezeigt, daß die Salicylsäure nicht wie angenommen als Signal über das Phloem vom infizierten Gewebe zu den anderen Pflanzenteilen transportiert wird und dort die SAR auslöst (Durner *et al*., 1997). Die Salicylsäure ist vielleicht ein Signal für die SAR, auf jeden Fall notwendig ist sie für den Aufbau und den Erhalt der von Salicylsäure abhängigen SAR.

1.1.4 Reaktionen von *Petroselinum crispum* nach Infektion mit *Phytophthora sojae*

Petroselinum crispum bildet wie *Ammi majus* nach Elicitierung Furanocumarine und diente einigen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der Pflanzenabwehr. Es ist anzunehmen, dass die Abwehr bei *Ammi majus* L. vergleichbar abläuft.

Die Abwehrreaktionen in *Petroselinum crispum* nach Infektion mit dem phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora* ssp. sind genauer an Zellkulturen untersucht worden. Hahlbrock *et al.* (1995) teilen die Abwehr in drei Stufen ein: Sie beginnt mit dem hypersensitiven Zelltod. Anschließend werden lokale Abwehrgene im umgebenden Gewebe aktiviert, was zu Aktivierung des Phenylpropanwegs und der Furanocumarinbiosynthese führt. Als drittes erfolgt im Rahmen der SAR die Aktivierung von systemischen Abwehrgenen. Den Ablauf in der Zelle haben Fellbrich *et al.* (2000) im Einzelnen untersucht. Sie konnten zeigen, dass nach Elicitierung die cytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration steigt, wohingegen die Konzentration an Cl^-- und K^+-Ionen sinkt. Außerdem akkumulieren nach der Änderung des Ionenflusses reaktive Sauerstoffspezies (Jabs *et al*., 1997). Beides bewirkt eine post-transkriptionelle Aktivierung von MAP-Kinasen und eine transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen. Bemerkenswert ist, dass nicht in allen Pflanzen reaktive Sauerstoffspezies an der Abwehr beteiligt sind (Rustérucci *et al*., 1996). Auch in Petersilie findet zwar ein

„oxidative burst“ statt, er ist aber nicht für die Aktivierung der elicitorresponsiven MAP-Kinasen notwendig (Kroj, 1999). H_2O_2 und Röntgenstrahlen, die zu reaktiven Sauerstoffspezies führen, sind beim Ablauf der Induktion ebenfalls wirksam (Kitamura *et al.*, 2002).

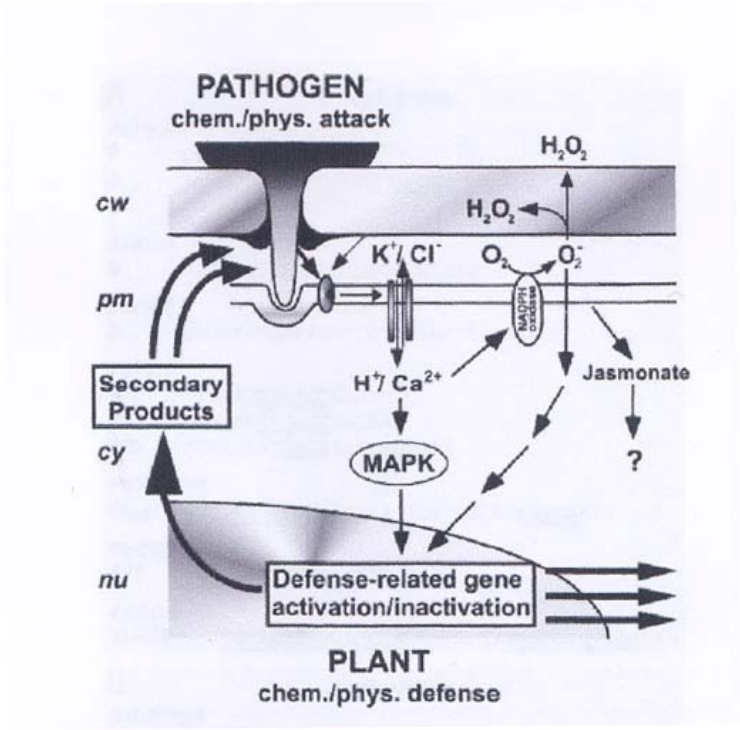


Abb. 3: Angenommenes Modell der Signaltransduktion der induzierten Abwehr in *Petroselinum crispum* (entnommen aus Hahlbrock *et al.*, 2003)

Eine interessante These haben Afek *et al.* (2002) aufgestellt. In *in vitro* Tests stellten sie fest, dass (+)-Marmesin eine stärkere antifungale Wirkung hat als Psoralen. Sie postulieren, dass Gibberelinsäure die Psoralensynthase hemmt und so den Befall von Petersilie nach der Ernte verlangsamt. So würde (+)-Marmesin beim Schutz vor Mikroorganismen während der Lagerung eine größere Rolle spielen als die Psoralene.

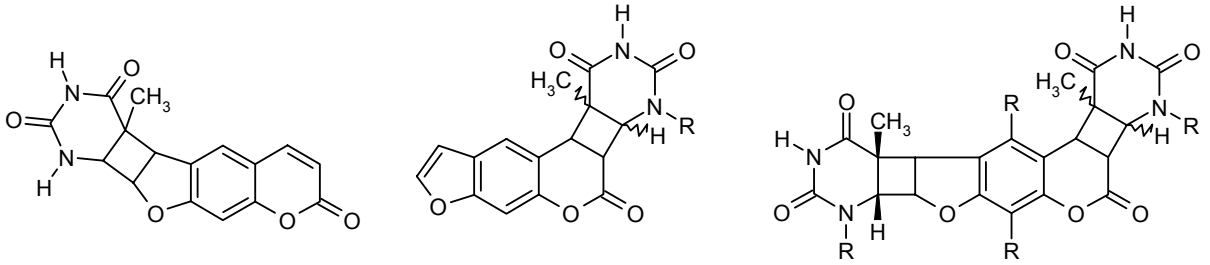
1.1.5 Bioaktivitäten der linearen Furanocumarine

Lineare Furanocumarine haben eine Vielzahl von Bioaktivitäten. Eine wichtige Eigenschaft ist ihre photodynamische Aktivität, die sich bei Berührung der Pflanzen und gleichzeitiger Sonnenbestrahlung mit Verbrennungssymptomen auf der Haut äußert. Zuerst beobachtet wurde dieser Effekt bei Feldarbeitern, die sich bei der Ernte von Sellerie eine Dermatitis zuzogen (Murray *et al.*, 1982). Außerdem wurden Photosensibilisierungseffekte bei Vieh in Texas in Verbindung mit *Ammi majus* beobachtet (Ivie, 1978). Furanocumarine wirken auf viele Organismen wie Bakterien, Pilze, Insekten und Säugetieren phototoxisch. Von den

natürlichen Cumarinen hat Psoralen die höchste photodynamische Aktivität. Die Konzentration an Psoralenen in Pflanzen, die eine akute Dermatitis auslöst beträgt 18 µg/g und bei einer chronischen Dermatitis 7-9 µg/g (Diawara *et al.*, 1995).

Die photodynamische Aktivität wird durch Interaktionen zwischen den Furanocumarinen und Nucleinsäuren verursacht. Als wichtigste Interaktion sind bei Doppelstrang-DNA die Interkalation und die Phtotoalkylierung zu nennen. Die Interkalation wird durch die planare aromatische Struktur und den hydrophoben Charakter ermöglicht, wobei anguläre Furanocumarine wesentlich weniger wirksam sind. Furanocumarine können neben Addukten mit RNA und DNA auch Addukte mit Proteinen bilden. Die Bindung an Proteine als Haptene erfolgt zum Beispiel bei Albumin (Murray *et al.*, 1982).

1966 beobachteten Dall'Aqua und Rodighiero (Murray *et al.*, 1982), dass Furanocumarine an DNA binden können, ohne mit Licht bestrahlt zu werden. RNA ist im Vergleich zu DNA ein schwächerer Bindungspartner. Die Bindung erfolgt über Thymin bzw. Uracil (Murray *et al.*, 1982), selten auch über Cytosin. *In vitro* ließ sich auch ein Adenin-Addukt beobachten. Bei der Reaktion handelt es sich um eine 2+2 Photocycloaddition. Musajo *et al.* (Murray *et al.*, 1982) identifizierten nach chemischer Behandlung mit 70 %iger Perchlorsäure und Bestrahlung C_4 Cycloaddukte, bei denen die Bindung über C4'/C5' im Furanring und C-5/C-6 des Pyrimidins (Thymin oder Cytosin) erfolgte (1). In geringerer Menge entstehen auch Addukte, bei denen das Furanocumarin über C3/C4 des Pyron-Teils an C5/C6 des Pyrimidins bindet (2). Durch die Absorption eines weiteren Photons, zum Beispiel bei weiterer Bestrahlung mit UV 360 nm, bilden sich aus den Monoaddukten die Diaddukte (3), die im Falle von ds DNA zum Crosslink führen (Murray *et al.*, 1982). Es hat sich herausgestellt, dass Bestrahlung mit dem gesamten UVA-Spektrum das Crosslinken besonders effizient induziert.



(1) **(2)** **(3)**

Abb. 4: Photocycloaddukte der Furanocumarine mit Thymin oder Cytosin

(1) C4' C5' Monoaddukt mit Thymin
(2) C3 C4 Monoaddukt mit Thymin
(3) Diaddukt

Im Jahre 2001 (Eichmann *et al.*, 2001) gelang es ein DNA-Psoralen-Crosslink-Produkt zu kristallisieren und anschließend die Struktur aufzuklären.

Die Monoaddukte können durch die Excisionsreparatur und Photolyasen wieder geöffnet werden. Photolyasen sind Bestandteil des UV-Reparatur-Systems in Pro- und Eukaryoten und können die Energie des sichtbaren Lichtes (340-400 nm) für die Spaltung des Cyclobutanringes ausnutzen. Besonders Pflanzen sind auf die Photolyasen angewiesen, da sie für die Photosynthese dem, schädigendem Licht ausgesetzt sind.

Furanocumarine stehen im verstärkten Verdacht, an der Entstehung (Musajo und Rodighiero, 1962) aber auch Heilung von Krebs beteiligt zu sein. Die Verursachung von Krebs hängt mit der Interkalation in die DNA zusammen. So haben Greber *et al.* (2003) beobachtet, dass Trimethylpsoralen durch Interkalation eine Deletion im Genom von embryonalen Stammzellen der Maus auslöst. Eine andere Arbeitsgruppe machte die Beobachtung, dass Furanocumarine gegen Krebs wirksam sind. In der Gegenwart von molekularem Sauerstoff können Furanocumarine wie viele andere Photosensibilisatoren durch die Absorption von Licht reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden und so die Zelle schädigen. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der Antitumoraktivität von verschiedenen Furanocumarinen und Pflanzenextrakten. So führt Imperatorin zum Beispiel zur induzierten Apoptosis in Leukämiezellen (Pae *et al.*, 2002), und ein Chloroformextrakt von *Angelica japonica*, der verschiedene Furanocumarine enthält, inhibiert das Zellwachstum von humanen Adenocarcinomzellen im Magen (Fujioka *et al.*, 1999).

Eine antimikrobielle Aktivität hat Ojala (2001) nachgewiesen. Sie stellte fest, dass Extrakte von *Petroselinum crispum* und *Ruta graveolens* eine hohe Toxizität gegen *Rhizoctonia solani* haben.

Bergapten ist ein potenter Kaliumkanalblocker. Da das phototoxische Potential eine medizinische Anwendung verhindert, wurden durch synthetische Abwandlungen Psoralenderivate hergestellt, die eventuell in Zukunft zur Blockade lymphozytärer Kaliumkanäle eingesetzt werden können (Vennekamp, 2002).

Des Weiteren gibt es noch eine Reihe von Einzelwirkungen, deren Zusammenhang noch nicht genau geklärt ist. So erlitten Floristen nach Kontakt mit *Ammi majus* eine allergische IgE-vermittelte Rhinitis und Urticaria (Kiistala *et al.*, 1999). Kim *et al.* (2002) haben festgestellt, dass Imperatorin unter anderem als Acetylcholinesteraseinhibitor wirkt und isolierte Furanocumarine aus *Peucedanum japonicum* inhibierten die Monoaminoxidase im Gehirn von Mäusen (Huong *et al.*, 1999). Ein methanolischer Extrakt aus *Peucedanum*

japonicum und besonders einige enthaltene Furanocumarine hemmen *in vitro* die Plättchenaggregation (Chen *et al*., 1996).

Ein Problem stellt die gleichzeitige Einnahme von Furanocumarinen und vielen Arzneistoffen dar, da sie *in vivo* den Metabolismus von einigen Xenobiotika inhibieren (Koenigs and Trager, 1998a und b). Zum Beispiel wird CYP3A, das eine große Rolle im Metabolismus von Medikamenten spielt, bei Einnahme von bestimmten Medikamenten mit Grapefruitsaft, gehemmt (Guo *et al*., 2000). Grapefruitsaft enthält verschiedene Furanocumarine, die vermutlich die Hemmung bewirken, was aber noch zu beweisen ist.

Insgesamt rufen die kovalente Bindung der Furanocumarine an die DNA, die Produktion von ROS und die Bindung an Rezeptoren, die an Zellwachstum- und Differenzierung beteiligt sind, viele Effekte hervor. Zielzellen sind unter anderem Epithezellen der Haut (Keratinozyten, Melanozyten) und Lymphozyten in den Blutgefäßen.

1.1.6 Anwendung der Furanocumarine in Medizin und Forschung

Furanocumarine haben in der Medizin (Bethea *et al*., 1999) und zur Untersuchung von DNA-Strukturen Bedeutung.

Schon 2000 vor Christus wurden Furanocumarin-haltige Pflanzen zur Hautpigmentstimulierung eingesetzt. Im Jahre 1948 hat el Mofty zum ersten Mal aus *Ammi majus* gereinigtes 8-Methoxypsoralen zur Behandlung von Vitiligo angewendet. Vitiligo ist eine Pigmentanomalie der Haut, bei der die Pigmentzellen verloren gehen. Aufgrund der photochemischen Eigenschaften werden Furanocumarine seit 1974 im Rahmen der PUVA-Therapie (**P**soralen und **UVA**) zur Behandlung von Vitiligo, Psoriasis und T-Zell-Lymphomen eingesetzt. Psoriasis ist unter anderem charakterisiert durch eine Hyperproliferation der Keratinocyten. Bei der PUVA-Therapie werden Psoralene als Lichtsensibilisatoren systemisch oder lokal verabreicht und anschließend wird mit UVA-Licht (320-400 nm) bestrahlt. Die Wahl von UVA anstatt von UVB geht laut Bethea *et al*. (1999) auf einen Fehler zurück, denn das Absorptionsspektrum von 8-MOP (303 nm) liegt im UVB-Bereich (El-Gorr und Norval, 1997). Auch die Bestrahlung mit UVB wurde getestet und erwies sich als genauso effektiv (El Mofty *et al*., 2001). Obwohl die Effektivität gleich ist, wird weiterhin UVA eingesetzt, da die Datenlage über Langzeiteffekte zu UVB geringer ist. Es werden 8-Methoxypsoralen (8-MOP), Trimethylpsoralen (TMP) und 5-Methoxypsoralen (5-MOP) verwendet. Als Wirkungsmechanismus der Reduktion der übermäßigen Epidermisbildung der Haut bei Psoriasis wird angenommen, dass die Furanocumarine an die epidermale DNA binden und so die Replikation und Transkription der DNA verhindert wird.

Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob der antiproliferative Effekt nur durch die Reaktion mit der DNA zustande kommt, oder eine Reihe von Effekten wie zum Beispiel die Hemmung des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) dazu führen. Als Wirkungsmechanismus bei der Behandlung von Vitiligo wird eine Steigerung der Repigmentation diskutiert (Pathak und Fitzpatrick, 1992), die aus einer Zunahme der Melaninsynthese resultiert. Lei *et al.* (2002) haben gezeigt, dass 8-MOP die Expression der Tyrosinase steigert und so die Melaninproduktion zunimmt.

Ein Problem der PUVA-Therapie ist das erhöhte Risiko, an Hautkrebs zu erkranken. Daher zielen neuere Studien auf die Synthese von Psoralenderivaten, die bei Vitiligo eingesetzt werden können, die aber nicht phototoxisch oder karzinogen sind (Mariano *et al.*, 2002). Eine weitere Nebenwirkung ist die beschleunigte Hautalterung, die durch eine Veränderung der Fibroblasten verursacht wird (Hermann *et al.*, 1998).

Auch in der Forschung werden Furanocumarine wegen ihrere Reaktivität mit Nucleinsäuren eingesetzt. Hier dienen sie der Struktur- und Funktionsaufklärung von DNA und RNA.

1.1.7 Interaktion zwischen Furanocumarinen und Insekten

Furanocumarine dienen der Pflanze als Fraßschutz vor Insekten, Mikroben und Vieh. Einige wenige Insekten haben jedoch im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um auf diesen Pflanzen leben zu können, manche haben sich sogar auf sie spezialisiert (Berenbaum und Zangerl, 1998; Berenbaum, 2002). Dazu gehören insbesondere einige Schmetterlinge (Ordnung Lepidoptera). Ungefähr 75 % der Gattung *Papilio* (Lepidoptera: Papilionodae) sind mit Furanocumarin-haltigen Pflanzen assoziiert, wobei *Papilio polyxenes* (Zebrafalter) auf solche Pflanzen spezialisiert ist. Weitere bekannte Beispiele sind *Depressaria pastinacella* (Lepidoptera: Oecophoridae) und *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae).

Bei der Detoxifizierung sind Cyt P450 der CYP6B-Genfamilie involviert (Ma *et al*, 1994; Hung *et al.*, 1997; Nitao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2000). Diese Monooxygenasen, die Furanocumarine abbauen sind bereits kloniert und analysiert worden (Chen *et al.*, 2002). In diesen Sequenzen wurde eine konservierte Substraterkennungssequenz SRS1 (substrate recognition site) identifiziert.

Neben Furanocumarin-abbauenden Cyt P450 kommen in Insekten auch Cyt P450 vor, die durch Xanthotoxin induziert werden. Offensichtlich vermitteln die induzierten Enzyme den Abbau bestimmter Insektizide, wie zum Beispiel α-Cypermethrin und damit eine erhöhte Toleranz gegen solche Insektizide (Li *et al.*, 2000). In der Interaktion von Furanocumarin-

haltigen Pflanzen und Insekten spielen Cyt P450 somit eine wichtige Rolle, wobei besonders interessant ist, dass an der Biosynthese der Furanocumarine ebenfalls einige Cyt P450 beteiligt sind.

1.2 Die Biosynthese der linearen Furanocumarine

Die Biosynthese der linearen Furanocumarine ist bereits in Vorstufenexperimenten untersucht worden. Aus L-Phenylalanin entsteht über den allgemeinen Phenylpropanweg das Umbelliferon und es sind mindestens acht Schritte bis zum Bergapten erforderlich. Die Enzyme, die Umbelliferon zu Bergapten umsetzen, sind bereits *in vitro* charakterisiert worden. Bis auf die Bergaptol O-Methyltransferase (BMT) aus *Petroselinum crispum* (Hahlbrock *et al*., 1995) und *Ammi majus* (Hehmann *et al*., 2003) konnte jedoch keines der Enzyme bisher kloniert werden.

1.2.1 Der generelle Phenylpropanweg

Im generellen Phenylpropanstoffwechsel entsteht aus L-Phenylalanin das Cinnamoyl- oder 4-Cumaroyl-CoA. Diese Ester sind erforderlich für eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten (z. B. Flavonoide, Lignine, Stilbene, Cumarine, Hydroxyzimtsäureester) und liefern das Substrat für die jeweiligen spezifischen Zweige des Phenylpropanstoffwechsels.

1.2.1.1 Wichtige Schritte der Phenylpropanbiosynthese

Ort des Phenylpropanstoffwechsels ist das Cytosol. Im ersten Schritt der Biosynthese wird durch die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL; EC 4.3.1.5) L-Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure oxidativ deaminiert. Das Enzym bildet damit die Brücke zwischen dem Primär- und dem Sekundärstoffwechsel. Die PAL ist ein tetrameres, lösliches Enzym, das durch mikrobielle Infektion induzierbar ist und meist durch eine Genfamilie kodiert wird (Wanner *et al*., 1995). Es konnten bereits viele PAL-Gene isoliert und sequenziert werden. Die Abspaltung der α-Aminosäure erfolgt nach einem besonderen nicht-oxidativem Mechanismus, wie er zuerst nach der Kristallisation der *Pseudomonas putida* Histidin Ammoniak-Lyase (HAL; EC 4.3.1.3; Schwede *et al*., 1999; Baedeker und Schulz, 2002) beschrieben worden ist. Die HAL deaminiert Histidin und hat ein ähnliches aktives Zentrum wie die PAL (Röther *et al*., 2000; Röther *et al*., 2002). Das reaktive Elektrophile 4-Methyliden-imidazol-5-on von dieser *trans*-Eliminierung entsteht autokatalytisch durch Zyklisierung und Dehydrierung der Aminosäuren 142-144 der HAL.

Die *trans*-Zimtsäure kann in *para*-Position zur *trans*-4-Cumarsäure hydroxyliert werden durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H; EC 1.14.13.11). Die C4H ist ein membrangebundenes Cyt P450, das durch Licht, Verwundung und Elicitoren induzierbar ist. Sie steht in enger Koordination mit der PAL. Nach der 4-Cumarsäure verzweigt sich der allgemeine Phenylpropanweg.

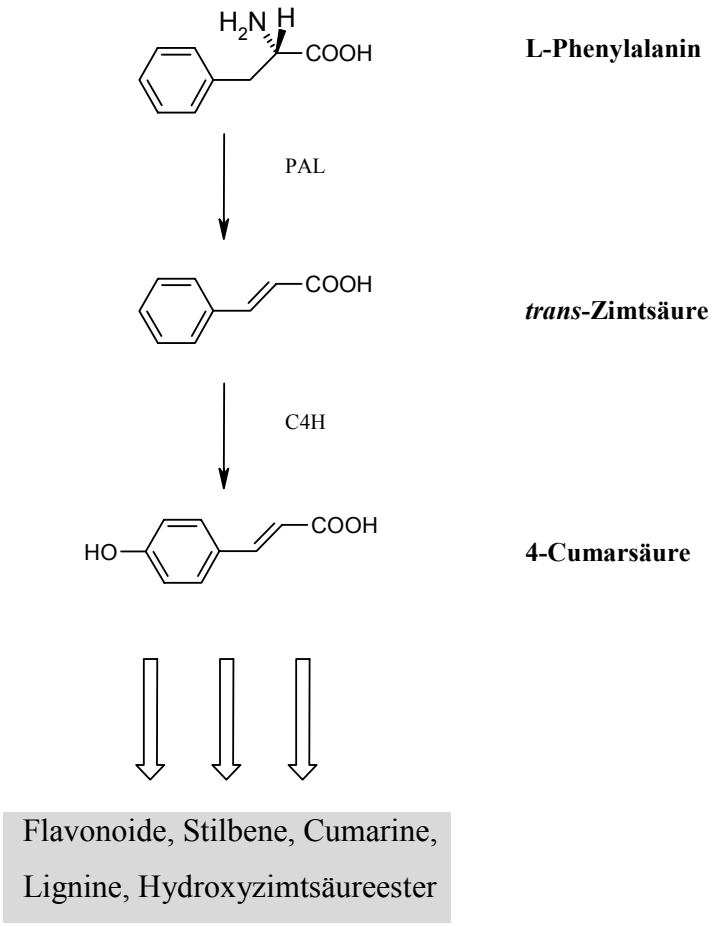


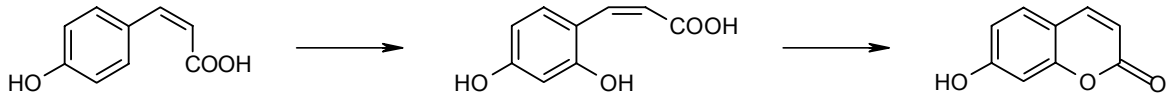
Abb. 5: Der allgemeine Phenylpropanweg

1.2.2 Die Biosynthese des Umbelliferons

Die genaue Biosynthese des Umbelliferons ist bis heute ungeklärt (Matern, 1991). Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, die beide von L-Phenylalanin als Vorstufe ausgehen. L-Phenylalanin-Fütterungsversuche haben gezeigt, dass *trans*-Zimtsäure oder 4-Cumarsäure als Vorstufe dienen. Im Falle des Cumarins, wie in *Melilotus*, fehlt die *para*-Hydroxylierung und Zimtsäure soll die direkte Vorstufe sein. Zwei Zyklisierungswege sind vorgeschlagen worden. Der eine Weg verläuft über eine *ortho*-Hydroxylierung der Zimtsäure bzw. der 4-Cumarsäure, wie sie unter anderem in Chloroplasten von *Melilotus* postuliert, jedoch nicht endgültig

bestätigt worden ist (Gestetner und Conn, 1974). Vor oder nach Hydroxylierung ist zudem eine trans-cis Isomerisierung erforderlich, die allerdings schon unter Tageslicht erfolgen kann. Die anschließende Lactonisierung würde unter Cyclisierung das Cumarin bzw. Umbelliferon liefern. Bei dem alternativen Weg (b) würde das Umbelliferon aus 4-Cumarsäure über ein Quinol bzw. über eine Spiroverbindung als Intermediat gebildet werden.

a)



b)

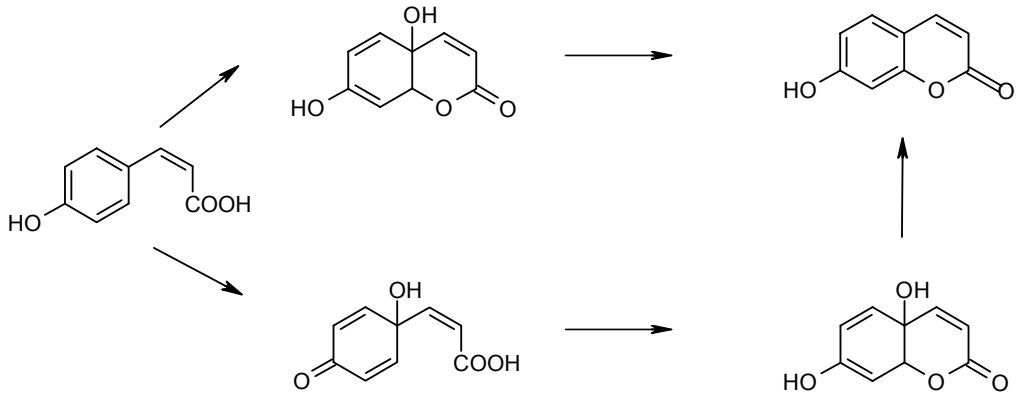


Abb. 6: Vorgeschlagene Wege der Bildung des Umbelliferons
(Übersicht in Grisebach und Ollis, 1961; Matern, U., 1991)

1.2.3 Die Prenylierung des Umbelliferons

Die Biosynthese der Furanocumarine beginnt mit der Prenylierung des Umbelliferons, wobei sich die Wege zu den Psoralenen (lineare Furanocumarine), den angulären Furanocumarinen un den Umbelliferonethern trennen; die C-Prenylierung in Position 6 führt zu Psoralen, in Position 8 zu Angelicin. In *Ammi majus* (Hamerski *et al.*, 1990) und *Petroselinum crispum* (Tietjen und Matern, 1983) sind zwei Prenyltransferaseaktivitäten nachgewiesen worden. Zum einen erfolgt in *Ammi majus* eine 7-O Prenylierung, die in weiteren Schritten zu den labilen Umbelliferonbutenylethern Coumarin A und B führt. Das O-Prenylumbelliferon selbst konnte nicht isoliert werden, muss aber als Vorstufe von Coumarin A und B dienen. Zum anderen wird das Umbelliferon durch eine C-Prenyltransferase am C-6 zum Demethylsuberosin (DMS) prenyliert, welches weiter zum Psoralen reagiert. Eine 8-

Prenylaseaktivität wurde in diesen Pflanzen nicht gemessen (Hamerski *et al.*, 1990). Das Demethylsuberosin konnte bisher nur selten isoliert werden (Gottlieb *et al.*, 1972), daher liegt die Vermutung nahe, dass es ein kurzlebiges Intermediat ist. Beide Prenyltransferasen sind abhängig von Mg^{2+} oder Mn^{2+}, wobei die C6-Prenylierung Mg^{2+} bevorzugt (Hamerski *et al.*, 1998). Die Umsetzungen erfordern Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), mit Isopentenyldiphosphat (IPP) wurde kein Produkt erhalten.

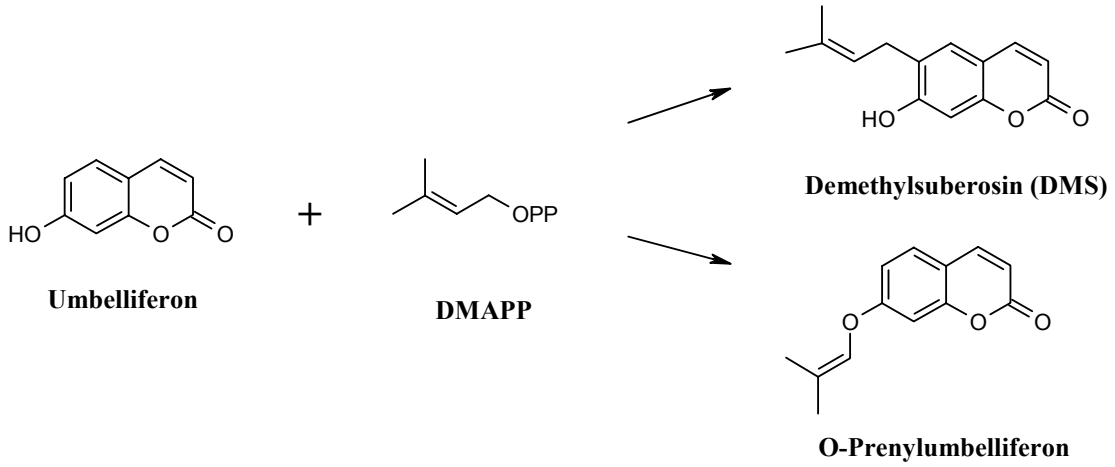


Abb. 7: Prenylierung des Umbelliferons

Zumindest bei der Biosynthese der Furanocumarine in *Apium graveolens* (Apiaceae) stammt das DMAPP für die Prenylierung nicht aus dem cytosolischen Mevalonatweg, sondern wird in den Plastiden über den von Mevalonat unabhängigen Weg, den MEP-Weg (MEP: 2-C-methyl-D-erythritol 4-Phosphat), gebildet. Es leitet sich von der 1-Deoxy-D-Xylulose (DOX) ab (Stanjek *et al.*, 1999), das durch Kondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat entsteht (Duvold *et al.*, 1997).

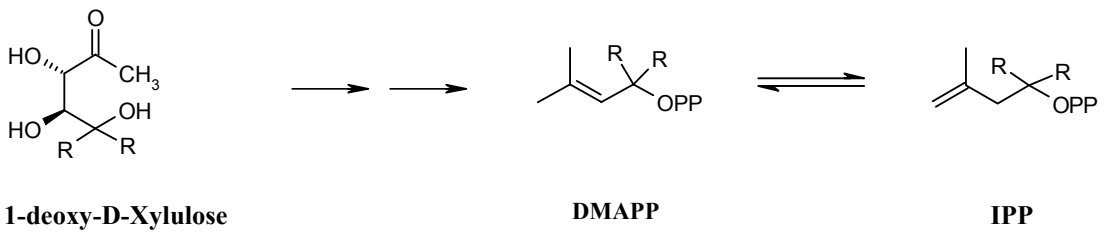


Abb. 8: Bildung des DMAPP über den MEP-Weg

Es ist anzunehmen, dass die Biosynthese von linearen Furanocumarinen anteilig in oder an Plastiden erfolgt, da auch in *Ruta* die Umbelliferon 6-C-Prenyltransferase den Plastiden zugeordnet wurde (Dhillon und Brown, 1976).

Die Aktivität aller an der Furanocumarinbiosynthese beteiligten Enzyme kann mit biotischen Elicitoren deutlich induziert werden (Hamerski und Matern, 1988). Dies wird unter anderem deutlich am Induktionsmuster der Prenyltransferasen. Isolierte Mikrosomen aus *Ammi majus* Zellkulturen, die über 14 Stunden mit Elicitoren induziert wurden, zeigen eine biphasische Aktivität (Hamerski *et al*., 1988) mit einem Maximum nach 10 bis14 Stunden und einem zweiten nach 30 bis 50 Stunden. Bemerkenswert ist, dass sich die Aktivität der PAL ebenfalls biphasisch verhielt (Hamerski *et al*., 1990).

Die Umbelliferonprenyltransferasen sind in *Ammi majus* membrangebunden (Hamerski und Matern, 1988). Ebenso wie in *Ruta* (Dhillon und Brown, 1976) oder auch im Falle der Isoflavonoidtransferase in *Phaseolus* und *Glycine* (Biggs *et al*., 1990) können diese Enzyme mit Plastiden assoziiert sein, obwohl die Unterscheidung von ER und plastidären Membranen weitere Untersuchungen erfordert.

1.2.4 Die Bildung von Marmesin

DMS wird durch die membrangebundene Marmesinsynthase *in vitro* zum (S)-Marmesin zyclisiert. Bei der Reaktion wurde dabei nur ein Hauptprodukt beobachtet und die Stereochemie des Marmesin wurde als (S) bestätigt (Hamerski und Matern, 1988). Die Marmesinsynthase aus *Ammi majus* und *Petroselinum crispum* wurde als Cyt P450 identifiziert und mit Hilfe spezifischer Inhibitoren als separates Enzym von anderen Cyt P450 des Cumarinweges (siehe unten) abgegrenzt. Dieser Aspekt verdient besondere Beachtung, weil pflanzliche Cyt P450 im Gegensatz zu tierischen eine enge Substratspezifität aufweisen.

Die Marmesinsynthase ist sowohl in *Ammi majus* als auch in *Petroselinum crispum* abhängig von NADPH und molekularem Sauerstoff und ist mit dem ER assoziiert. Aktiv ist sie vermutlich im Lumen des ER. Ihre maximale Aktivität hat sie 12 h nach Induktion mit *Pmg*.

Der hypothetische Reaktionsmechanismus wird nach Brown *et al.* (1970) wie folgt formuliert: Der erste Schritt ist eine Epoxidierung der Doppelbindung des Prenylrestes. Unter oxidativer Öffnung des Epoxids wird ein Diol gebildet. In einer S_N-2-Reaktion wird unter Inversion der Konfiguration intramolekular zum Marmesin verethert. Dieser Mechanismus konnte jedoch bisher *in vitro* nicht bestätigt werden.

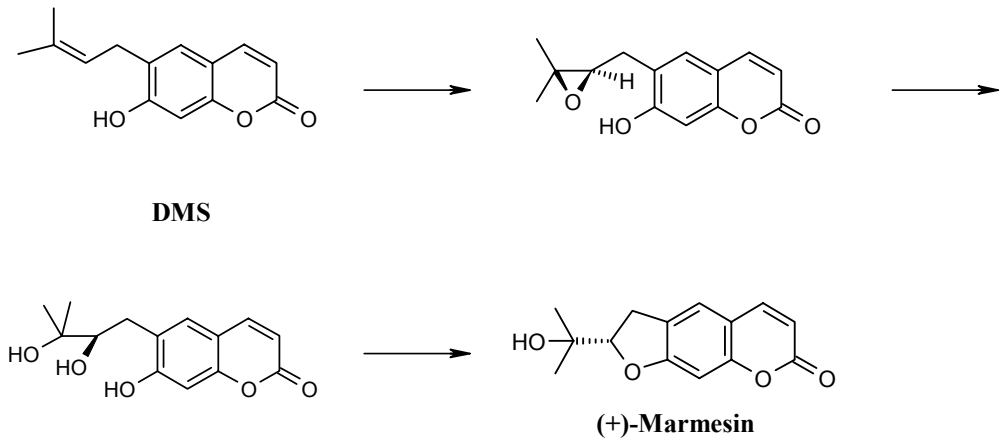


Abb. 9: Hypothetischer Mechanismus der Bildung von (+)-Marmesin aus DMS
(Brown *et al.*, 1970)

1.2.5 Die Psoralensynthase

Die Psoralensynthase katalysiert die Umsetzung vom (+)-Marmesin zum Psoralen. Dieses Enzym wurde ebenfalls als Cyt P450, abhängig von NADPH und molekularem Sauerstoff, identifiziert. Wie die Marmesinsynthase ist sie mit dem ER assoziiert. Da der größte Teil der Psoralene von den Zellen sezerniert wird, ist sie vermutlich im Lumen des ER aktiv.

Die Aktivität der Psoralensynthase ist zuerst in mikrosomalen Fraktionen aus induzierten Zellkulturen von *Petroselinum crispum* mit Hilfe von (±)[3-^{14}C]Marmesin gemessen worden (Wendorff und Matern, 1986). Das Enzym bevorzugt (+)-Marmesin und setzt (-)-Marmesin kaum um (Murray *et al.*, 1982). Die Inkubationen mit Mikrosomen aus *Pmg*-induzierten Zellen lieferten ein zweites noch unbekanntes Produkt, das vermutlich ein Zwischenprodukt der Graveolonbiosynthese aus (+)-Marmesin ist (Tietjen *et al.*, 1983).

Der Mechanismus der Psoralensynthase ist sehr ungewöhnlich. Einerseits handelt es sich um eine C/C-Spaltung, die in der Natur nicht häufig vorkommt. Andererseits wurde postuliert, dass in der Reaktion Aceton freigesetzt wird. Dafür gab es keine Präzedenz. Es erschien deshalb zunächst wahrscheinlicher, dass wie zum Beispiel im Rahmen der Steroidbiosynthese in zwei Schritten eine Methyl- und eine Acetylgruppe abgespalten werden. Inzwischen ist der Mechanismus der oxidativen Bindungsspaltung untersucht worden (Stanjek *et al.*, 1998; Stanjek *et al.*, 1999). Die Umsetzung von spezifisch deuteriertem Marmesin wurde sowohl mit Mikrosomen aus *Ammi majus* als auch mit Tetraphenylporphyrinatokomplexen von Fe^{3+} und Mn^{3+} und Iodosylbenzol als Oxidationsmittel zur Simulierung von Cyt P450 durchgeführt. Als erstes greift das Porphyryl-Fe^{IV}-O-Radikalkation des Enzyms stereospezifisch das 3'-H_s an, wodurch ein Benzylradikal

entsteht. Dieses zerfällt durch eine β-Spaltung in Psoralen und ein 2-Hydroxy-2-propyloxyradikal, das als Aceton abgegeben wird. Insgesamt handelt es sich um eine insertierte *syn*-Eliminierung von C-3'H_s und einem 2-Hydroxy-2-propyl-Substituenten.

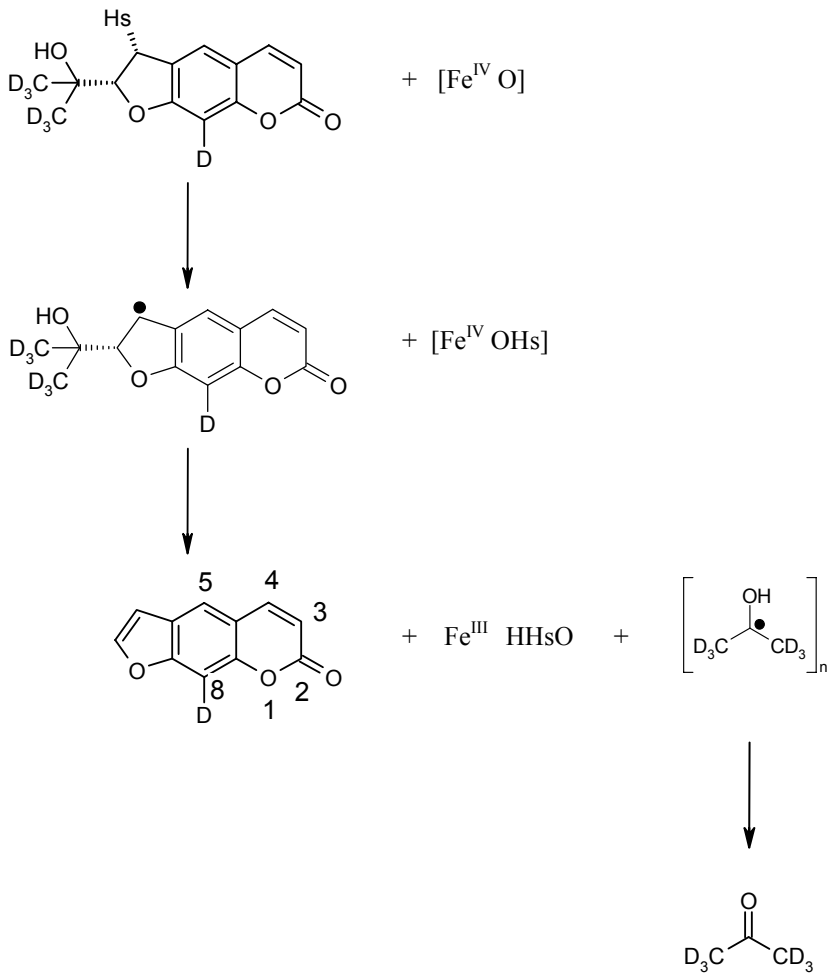


Abb. 10: Bildung von Psoralen aus (+)-Marmesin

1.2.6 Produkte aus Psoralen

Es sind verschiedene Folgeprodukte des Psoralen bekannt. So kann es zunächst in Position 5 bzw. 8 zum Xanthotoxol bzw. Bergaptol hydroxyliert werden. Die Hydroxylierung zum Bergaptol wird durch die Psoralen 5-Monooxygenase, einem Cyt P450, katalysiert, die in Mikrosomen aus induzierten *Ammi majus* Zellen nachgewiesen werden konnte (Hamerski und Matern, 1988b). Wie die anderen Cyt P450 ist sie abhängig von NADPH und molekularem Sauerstoff. Die Hydroxylierung am C8 zum Xanthothoxol erfolgt vermutlich auch über ein Cyt P450, konnte aber bisher nicht *in vitro* nachgewiesen werden. Daneben ist das

Isopimpinellin isoliert worden, das in C5 und C8 methoxyliert ist und ein entsprechendes Dihydroxypsoralen erfordert.

Bergaptol wird durch die S-adenosyl-L-methionin:Bergaptol O-Methyltransferase (BMT) gebildet (Hauffe, 1988), Xanthotoxol durch die S-adenosyl-L-methionin:Xanthotoxol O-Methyltransferase (XMT). Beide Methylierungen finden durch lösliche Enzyme im Cytoplasma statt. Die BMT wurde kürzlich kloniert und funktionell charakterisiert (Hehmann *et al*., 2003).

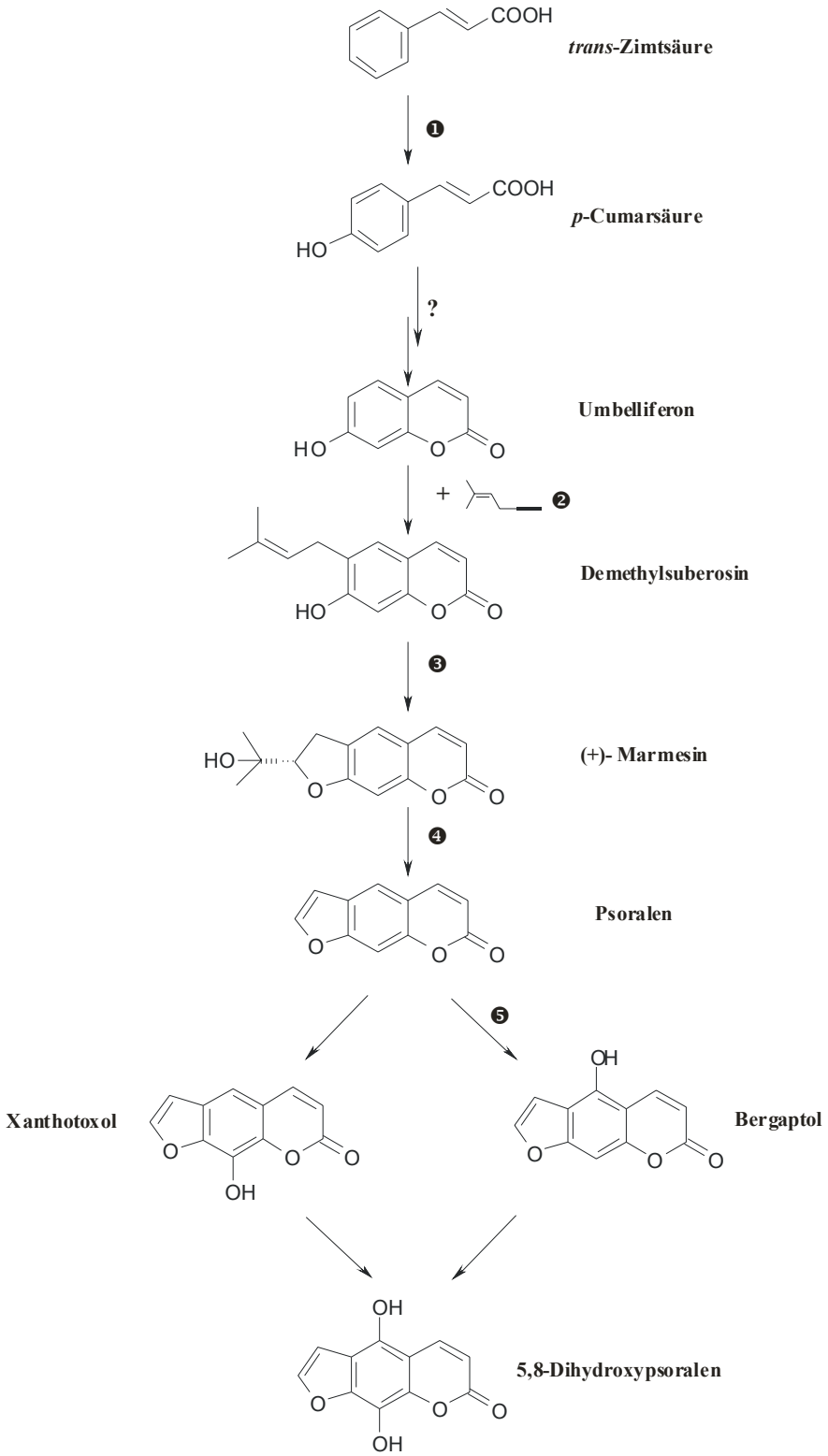


Abb. 11: Biosynthese der linearen Furanocumarine

❶ Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H; Cyt P450, O_2- und NADPH-abhängig)
❷ DMAPP:Umbelliferon Dimethylallyltransferase
❸ Marmesinsynthase (Cyt P450, O_2- und NADPH-abhängig)
❹ Psoralensynthase (Cyt P450, O_2- und NADPH-abhängig)
❺ Psoralen-5-monooxygenase (Cyt P450, O_2- und NADPH-abhängig)

1.2.7 Induzierbarkeit der Furanocumarinbiosynthese

Ein wichtiges Merkmal ist die Induzierbarkeit der Biosynthese, Furanocumarine kommen jedoch auch in gesunden Pflanzen vor (Beier *et al*., 1983). Die Induktion kann durch Insektenfraß, Pathogene, Licht, Methyljasmonat, Fungizide (Nigg *et al*., 1997) und Luftverschmutzung erfolgen (Dercks *et al*., 1990). Zum Beispiel sinken in *Apium graveolens* und *Petroselinum sativum* im Winter durch weniger Licht die Konzentrationen an Bergapten, Xanthotoxin und Isopimpinellin (Innocenti *et al.*, 1976). Grosse Probleme bereitet der über 500 % erhöhte Gehalt an Furanocumarinen in Sellerie durch den sauren Nebel in Kalifornien (Dercks *et al*., 1990).

Im Falle der Zellkulturen nimmt nach Induktion mit *Pmg* das Zellwachstum ab, was sich zum Beispiel in einer Inhibition der Sterolbiosynthese äußert (Fulton *et al*., 1993; Haudenschild und Hartmann, 1995). Zudem hat sich eine vermehrte Aufnahme von monomeren und polymeren Phenolen in die Zellwand gezeigt (Kauss *et al*., 1993).

1.3 *Ammi majus* L. - Inhaltsstoffe und Bedeutung

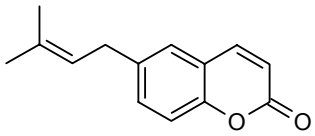
Eine Pflanze, die sich durch ihren Psoralengehalt zur Untersuchung der Furanocumarinbiosynthese eignet ist *Ammi majus* L., die Große Knorpelmöhre. Sie gehört zu der Familie der Apiaceae und ist eine einjährige Pflanze. Ursprünglich kommt sie aus dem Nildelta und wächst jetzt vor allem im Mittelmeerraum. *Ammi majus* hat weltweite Verbreitung und ist als Unkraut auf Viehweiden nicht gern gesehen. Die weite Verbreitung zeigt aber, dass sie sich sehr gut gegen viele potentielle Pathogene behaupten kann, auch unter wechselnden klimatischen Bedingungen.

Abb. 12: *Ammi majus* L.

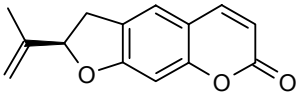
In *Ammi majus* L. und seinen Zellkulturen sind unter anderen folgende Inhaltsstoffe beschrieben worden:

- Cumarine und Cumaringlucoside (Elgamal *et al*., 1993), darunter lineare Furanocumarine (Murray *et al*., 1982) wie z. B. Psoralen, Xanthotoxin
- Umbelliferonether
- acylierte und nichtacylierte Flavonolglykoside (Nasser und Singab, 1998)

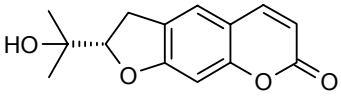
Furanocumarine



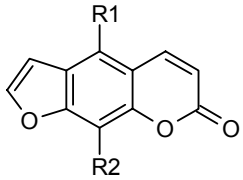
Demethylsuberosin



Ammirin

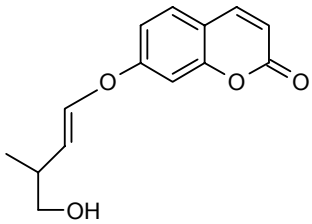


(+)-Marmesin

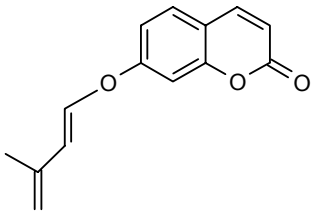


R1= R2 = H	Psoralen
R1= OH, R2 = H	Bergaptol
R1 = H, R2 = OH	Xanthotoxol
R1 = OCH_3, R2 = H	Bergapten (5-MOP)
R1 = H, R2 = OCH_3	Xanthotoxin (8-MOP)
R1 = R2 = OCH_3	Isopimpinellin

Umbelliferonether



Coumarin A



Coumarin B

Abb. 13: Ausgewählte Inhaltsstoffe von *Ammi majus* L.

Das erste isolierte Furanocumarin aus *Ammi majus* war Xanthotoxin (Fahmy *et al*., 1947). Die Bildung der Furanocumarine, Umbelliferonether und Ferulasäureester in *Ammi majus* ist durch Infektion induzierbar.

1.4 Cytochrom P450 Enzyme

Die Familie der Cytochrom-P450-abhängigen Enzyme (Cyt P450) ist von großer Bedeutung für alle lebenden Organismen. Über sie sind viele Übersichtsartikel geschrieben worden (Bolwell *et al*., 1994; Chapple, 1998; Degtyarenko und Kulikova, 2001; Donaldson und Luster, 1991; Graham und Peterson, 1999; Guengerich, 1991; Guengerich 2002; Halkier, 1997; Kahn und Durst, 2000; Nelson und Strobel, 1987; Nelson, 1999; Omura, 1999; Schuler und Werck-Reichhart, 2003; Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000).

Die Enzyme mit Molmassen von 45-62 kDa gehören zu der Gruppe der Hämthiolatproteine, die in fast allen lebenden Organismen und in den verschiedensten Geweben vorkommen (Nelson *et al*., 1993). Sie sind am Auf- und Abbau von endogenen und exogenen Stoffen beteiligt. Ihr Name leitet sich von dem Absorptionsmaximum (Soret Bande) im CO-Differenzspektrum bei 450 nm ab (Omura und Sato, 1964). Das „P" steht für Pigment. Die lichtreversible Inhibition durch Kohlenmonoxid ist ein wichtiges Merkmal aller P450-Enzyme.

Cytochrom P450-Enzyme sind aus einem b-Typ Häm-Chromophor (Eisen-Protoporphyrin IX) und einem Apoprotein aufgebaut. Das Häm wird über ein hochkonserviertes Cystein an das Apoprotein gebunden.

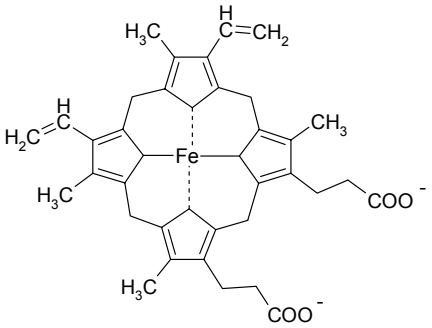


Abb. 14: Häm Typ b

Prokaryotische P450 sind lösliche Enzyme, eukaryotische dagegen sind an die Mitochondrienmembran, Chloroplastenmembran oder das ER gebunden. Bei mikrosomalen Cyt P450 erfolgt die Verankerung mit dem ER über eine hydrophobe Helix in der Nähe des N-Terminus. Nur Tiere besitzen auch Cyt P450, die an die innere Mitochondrienmembran gebunden sind. Es gibt lediglich eine Cyt P450 Genfamilie CYP51, die sowohl in Tieren und Pflanzen als auch in Pilzen vorkommt.

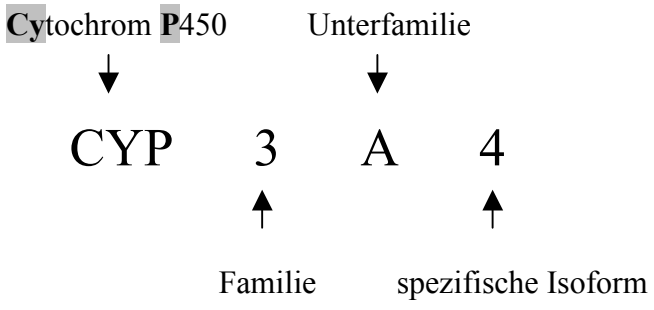
1.4.1 Einteilung und Nomenklatur

Bei den Cyt P450 unterscheidet man je nach Elektronentransportkette vier Klassen: Klasse I Proteine, zu denen lösliche bakterielle und mitochondriale aus Wirbeltieren gehören, brauchen zur Elektronenübertragung eine FAD-haltige Reduktase und ein Ferredoxin. Das Elektron wird von NAD(P)H (NADH bei bakteriellen, NADPH bei mitochondrialen P450) über die Redoxin-Reduktase und Redoxin auf das Häm und dann auf das Substrat übertragen. Klasse II Proteine, die in Bakterien und Eukaryoten vorkommen, benötigen nur eine FAD/FMN-haltige Reduktase. In manchen Fällen ist das Cytochrom b_5 zwischengeschaltet (siehe Abb. 15). Der Elektronenfluss läuft wie folgt ab:

$$\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{Häm} \rightarrow O_2$$

Proteine der Klasse III wurden in Tieren und Pflanzen beschrieben und kommen ohne Elektronendonor und Sauerstoff aus, und Proteine der Klasse IV aus Pilzen erhalten die Elektronen direkt von NAD(P)H. Die Klasse I und II umfassen mitochondriale, mikrosomale und einige bakterielle P450. Ein bekannter Vertreter der Klasse II ist die $P450_{BM\text{-}3}$ aus *Bacillus megaterium*. In Eukaryoten kommen vor allem Cyt P450 der Klasse II vor.

Nelson *et al*. (1996) haben ein System für die Benennung von Cyt P450 aus allen Organismen aufgestellt, nach dem alle Cyt P450 phylogenetisch nach ihrer Aminosäure-sequenzidentität in Familien und Unterfamilien unterteilt werden. Die Funktion der Proteine wird dabei außer Acht gelassen. Bei einer Homologie der Aminosäuresequenz von über 40 % werden sie einer Familie zugeordnet, die mit einer arabischen Zahl gekennzeichnet wird, zum Beispiel CYP73. Beträgt die Homologie über 55 % gehören sie zur gleichen Unterfamilie, was durch einen Großbuchstaben ausgedrückt wird (z. B. CYP73A). Die spezifische Isoform wird durch eine weitere arabische Zahl angegeben. Bei über 97 % Homologie spricht man von allelischen Varianten.



Grundsätzlich unterscheidet man bei pflanzlichen Cyt P450 zwei Hauptgruppen, den A-Typ und „Non-A-Type“. Enzyme vom A-Typ sind spezifisch für Pflanzen und an der

Biosynthese von Sekundärstoffen beteiligt (Durst und Nelson, 1995). Sie stammen ursprünglich alle vom selben Gen ab (Paquette *et al.*, 2000). Cyt P450 vom „Non-A-Type“ sind sehr heterolog und stellen keine Gruppe im phylogenetischen Sinne dar.

Da inzwischen viele Cyt P450 aus verschiedenen Organismen kloniert worden sind, hat Nelson (1998) eine Klassifizierung nach CLANS vorgeschlagen. Demnach kommen in Pflanzen 4 CLANS vor: 71, 72, 85, 86 (Nelson, 1999).

1.4.2 Der Reaktionszyklus der Cyt P450

Als mischfunktionelle Oxygenasen übertragen Cyt P450 ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff auf das Substrat und eines auf Wasser. Da Cyt P450 am Auf- und Abbau von vielen wichtigen Stoffen beteiligt sind, müssen sie dabei die verschiedensten Reaktionen wie Dealkylierungen, Epoxidationen und Deaminierungen katalysieren. Die beiden Reduktionsäquivalente werden bei den meisten Cyt P450 von der NADPH Cytochrom P450-Reduktase (CPR; NADPH: Cyt P450 E.C. 1.6.2.4; siehe 1.4.6) auf das Häm übertragen. Die CPR ist ein Flavoprotein, das FAD oder FMN als prosthetische Gruppe enthält. Der Elektronenfluss findet von NADPH über FAD und FMN zum Häm statt. Wie auch die eukaryotischen Cyt P450 ist die Reduktase über den N-Terminus an die cytoplasmatische Seite des ER gebunden. Die Reduktionsäquivalente werden durch elektrostatische Interaktionen auf der Membran des ER übertragen (Shen und Kasper, 1995).

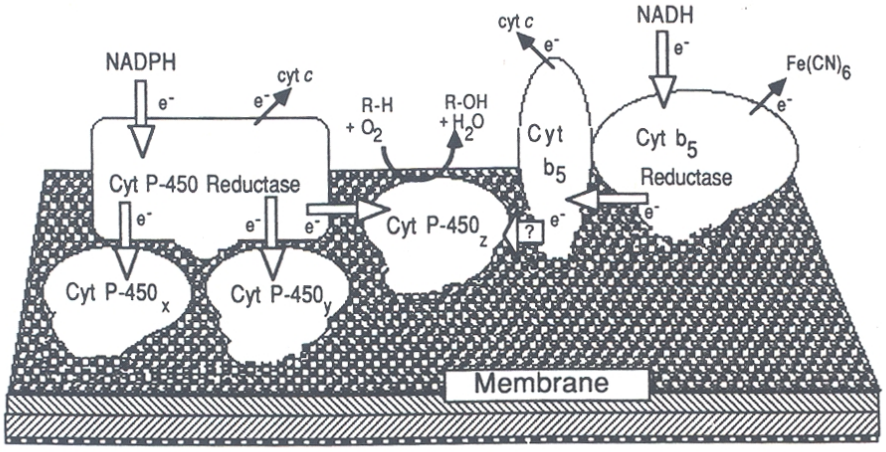


Abb. 15: Anordnung der Reduktase, des Cyt b5 und des Cyt P450 an der Membran des ER

Der Elektronenfluss geht vom NADPH über die NADPH-Cyt P450 Reduktase zum Cyt P450. In manchen Fällen kann auch Cyt b_5 als Elektronenlieferant dienen, das die Elektronen wiederum von NADH über die NADH:Cyt b5 Reduktase erhält.
(entnommen aus Donaldson und Luster, 1991)

Die Summengleichung der Reaktion kann wie folgt formuliert werden:

$$RH + O_2 + NADPH,H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

Im Ruhezustand liegt das Eisen als Fe(III)-low-spin-Komplex vor. Vier der sechs Koordinationsstellen sind von den Stickstoffatomen des Porphyringrundgerüstes besetzt. Der fünfte Ligand ist das Thiol des Cysteins vom Proteinteil und der sechste Wasser. Der Reaktionszyklus wird durch die Bindung des Substrates an das Fe^{3+} des Enzyms eingeleitet, wodurch das Eisen vom low spin- in die high spin-Form übergeht ❶. Anschließend wird das Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert, wobei das Elektron durch die CPR von NADPH geliefert wird ❷. Das Fe^{2+} koordiniert molekularen Sauerstoff ❸, der durch ein zweites Reduktionsäquivalent von NADPH aktiviert wird ❹. Durch Zerfall des RH Fe^{3+}-O_2^{2-} Komplexes entsteht unter Wasseraustritt der aktivierte $(Fe\text{-}O)^{3+}$ Komplex. Dieser Komplex steht mit einer radikalischen Ferryl-Spezies im Gleichgewicht ❺. Dieses Radikal ist in der Lage an einer nicht aktivierten Stelle im Substrat durch Übernahme eines H• ein Substratradikal zu erzeugen ❻. Dieses so aktivierte Substrat wird zu primären Alkohol hydroxyliert und anschließend freigesetzt ❼.

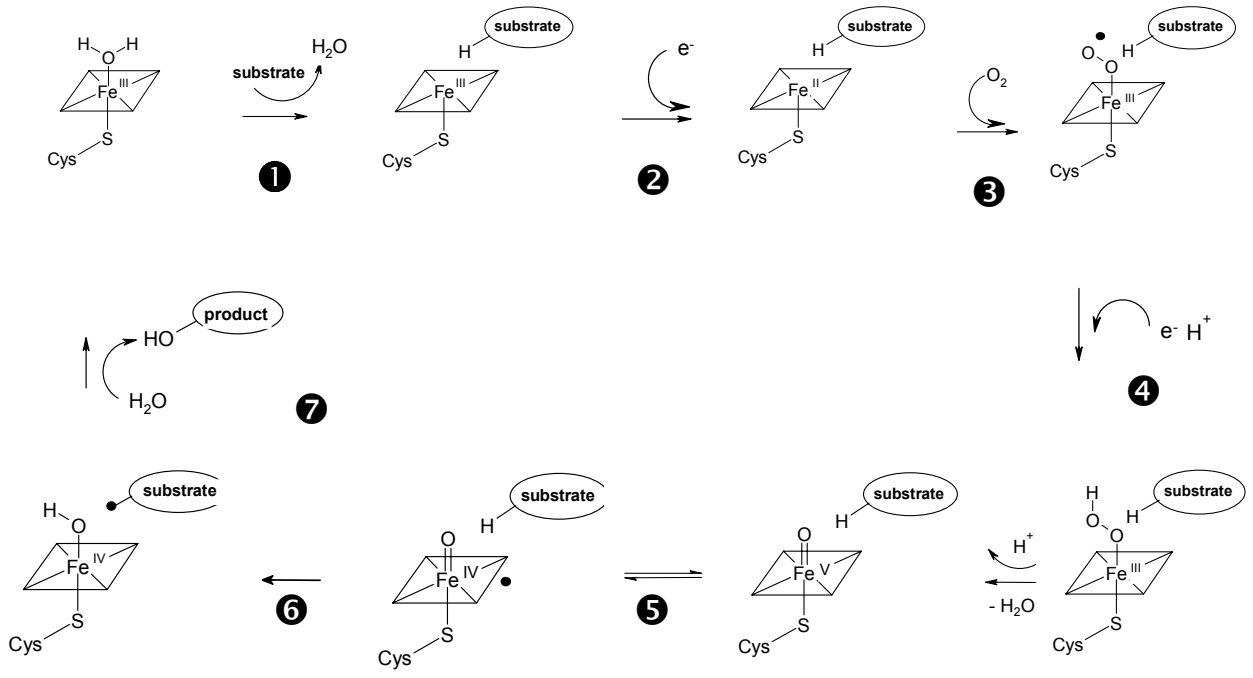


Abb. 16: Katalytischer Reaktionszyklus der Cyt P450

Die Bildung des Cyt P450-Substratkomplexes bewirkt charakteristische spektrale Veränderungen. Im Grundzustand liegt Eisen im Chromophor als Fe(III)-low-spin-Komplex vor. Mit der Substratbindung und der Bildung von einem Enzym-Substrat-Komplex, kommt es zur Umwandlung in einen high-spin-Komplex. Der Übergang geht einher mit einer Änderung des Redoxpotentials und erleichtert die erste Reduktion des Eisens im katalytischen Zyklus. Außerdem äußert er sich in einem Wechsel der Maxima des Differenzspektrums. Das hexakoordinierte low-spin-Cytochrom hat seine Maxima bei 416, 535 und 565 nm, das pentakoordinierte high-spin-Cytochrom bei 392, 540 und 645 nm (Jefcoate, 1978). Das Spektrum des high-spin-Cytochroms wird auch als Typ I-Differenzspektrum bezeichnet.

1.4.3 Die Struktur eukaryotischer Cyt P450

Auch wenn Cyt P450 oft weniger als 20 % Sequenzidentität haben, gibt es in ihrer Primär- und Tertiärstruktur einige konservierte Bereiche. Über die Quartärstruktur existieren vor allem Daten von bakteriellen Cyt P450.

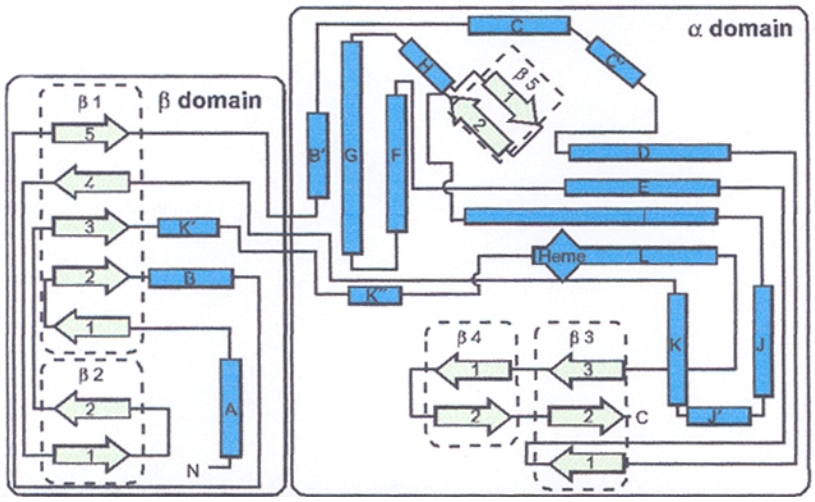
Da noch kein pflanzliches Cyt P450 kristallisiert worden ist, nimmt man als Modell für die räumliche Struktur die bakteriellen und tierischen Enzyme zur Hilfe, auch wenn einige Merkmale grundsätzlich verschieden sind. Die Sekundär- und Tertiärstrukturen von den folgenden löslichen bakteriellen P450-Enzymen sind bereits mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt worden: $P450_{cam}$ (CYP101) von *Pseudomonas putida* (Poulos *et al.*, 1987), $P450_{BM-3}$ (CYP102) von *Bacillus megaterium* (Ravichandran *et al.*, 1993) und $P450_{terp}$ (CYP108) von *Pseudomonas* spec. (Hasemann *et al.*, 1994). Von den eukaryotischen Cyt P450 sind $P450_{eryF}$ (CYP107A1) von *Saccharomyces erythraea* (Cupp-Vickery und Poulos, 1995), CYP2C5 vom Hasen (Williams *et al.*, 2000) und P450nor (CYP55) aus dem Pilz *Fusarium oxysporum* kristallisiert worden. Kürzlich gelang die Klonierung von CYP2C9 des Menschen, das am Arzneistoffmetabolismus beteiligt ist (Williams *et al.*, 2003).

Tierische Cyt P450 haben zwei Domänen, von denen die eine reich Helices ist und das Häm enthält und die andere besteht aus meist antiparallelen β-Faltblättern. Diese beiden Domänen werden durch den so genannten „Meander“ verbunden. Der Meander ist reich an aromatischen Aminosäuren und Prolin und befindet sich zwischen der Helix K und der Hämbindungsregion. Das strukturelle Zentrum wird von von den Helices D, E, I, L, J und K geformt (Graham und Peterson, 1999).

Hasemann *et al.* (1995) haben die Topologie der $P450_{cam}$, der $P450_{terp}$ und der $P450_{BM-3}$ miteinander verglichen und festgestellt, dass sie sich sehr ähnlich sind und nur lokale Unterschiede in der I-Helix vorhanden sind. Außerdem fiel ihnen bei einem Vergleich

von löslichen und membrangebundenen P450s auf, dass das Faltungsmuster konserviert ist und dass sich das Häm immer zwischen der L-Helix und der I-Helix befindet („Heme-binding loop“). Die Oberfläche in der Nähe des Häms interagiert mit der membrangebundenen CPR.

a)



b)

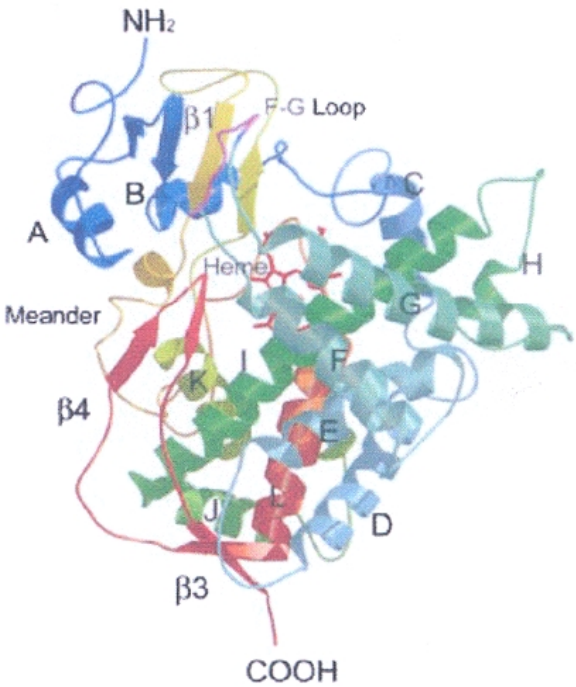


Abb. 17: Sekundär- und Tertiärstruktur

a) Sekundärstruktur eines typischen Cyt P450 (CYP102) (aus: Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000)

b) Tertiärstruktur von P450 2C5/3LVdH (aus: Williams *et al.*, 2000)

Die Aminosäuresequenzen pflanzlicher mikrosomaler Cyt P450 weisen mehrere konservierte Bereiche auf (Abbildung 18). Die ersten 20-30 Aminosäuren am N-Terminus sind überwiegend hydrophob und bilden den hydrophoben Membrananker (A). In der Nähe des N-Terminus befindet sich die Prolinreiche Region mit der Konsensussequenz [(P/I)PGPx(G/P)xP] (B). Sie sorgt für eine ausreichende Flexibilität zwischen dem Membrananker und dem globulären Teil und unterstützt die Stabilisierung des Enzyms. Ungefähr 60 % entfernt vom C-Terminus ist die Sauerstoffbindungsdomäne mit der Konsensussequenz [(A/G)Gx(D/E)T(T/S)] (Halkier, 1997) (C). Die EER Triade [ExxR…..R] beinhaltet das Glutamin und Arginin aus der Konsensussequenz [K**E**TL**R**] und das Arginin aus der Konsensussequenz [PE**R**F] (Werck-Reichhart *et al.*, 2002) (D, E). Sie hilft bei der Stabilisierung und Positionierung des Häms in der Bindungstasche (Hasemann *et al.*, 1995). Am höchsten konserviert ist die Hämbindungsdomäne [PFGxGRRx**C**xG], bei der das Cystein als fünfter axialer Ligand des Häm-Eisens dient (F). Sie befindet sich ca. 15 % vom C-Terminus entfernt. Von diesen Sequenzfolgen kommen nur die EER Triade und das PFG-Motiv in fast allen pflanzlichen Cyt P450 vor.

Abb. 18: Schematische Darstellung der Struktur von membranständigen Cyt P450

A: hydrophober Membrananker
B: Prolinreiche Region mit der Konsensussequenz [(P/I)PGPx(G/P)xP]
C: I Helix mit Ala-Ala-Motiv, enthält die Sauerstoffbindungsregion [(A/G)Gx(D/E)T(T/S)]
D: [KETLR]-Motiv
E: Region mit der Konsensussequenz [PERF]
F:Haembindungsregion mit der Konsensussequenz [PFGxGRRxCxG]

Die Substratbindung erfolgt wahrscheinlich in der Nähe des Häms. Gotoh (1992) hat in einem speziellen Alignment von 51 CYP2 und 8 bakteriellen P450s sechs „subtrate recognition sites“ (SRS) entdeckt.

Rupasinghe *et al.* (2003) haben vier Cyt P450 (CYP73A5, CYP75B1, CYP84A1, CYP98A3) aus dem Phenylpropanstoffwechsel in *Arabidopsis* mit „Molecular Modeling“ und „Substrat-Docking“ untersucht. Dabei haben sie festgestellt, dass die Primärsequenzen weniger als 13 % Identität zeigen, aber das katalytisch aktive Zentrum hoch konserviert ist. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es in Bezug auf die Substratorientierung und der Lokalisation und Aminosäurefolge der SRS einen gemeinsamen Mechanismus der Substraterkennung gibt.

1.4.4 Cyt P450 in Pflanzen

Das erste Cyt P450 wurde 1958 in Lebermikrosomen von Ratten entdeckt (Klingenberg, 1958, Garfinkel, 1958). 1990 gelang es, das erste pflanzliche Cytochrom P450 aus dem Mesokarp von Avocado zu klonieren (Bozak *et al*., 1990). Seitdem ist eine Vielzahl von Cyt P450 aus Pflanzen isoliert worden. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* gibt es 273 Cyt P450 Gene (http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html) und in Pflanzen sind bis zum Jahr 2000 46 Genfamilien entdeckt worden (Williams *et al*., 2000). Pflanzliche Cyt P450 gelten im Gegensatz zu tierischen Cyt P450 als sehr substratspezifisch. Sie sind an der Biosynthese der verschiedensten Substanzen beteiligt, so zum Beispiel an der Bildung von Pigmenten (Anthocyanidine), Pflanzenhormonen (Gibbereline), Phenylpropanoiden, Fettsäuren, Phytoalexinen (Terpene, Furanocumarine, Glucosinolaten), cyanogenen Glycosiden, Signalprodukten (Salicylsäure, Jasmonsäure) und Alkaloiden. Die gebildeten Stoffe spielen in der Pflanze eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr, dem UV-Schutz, der Membranbildung und der Pigmentierung. Viele pflanzliche Cyt P450 lassen sich zum Beispiel durch UV-Strahlung (Kato *et al*., 1994), Verwundung (Frank *et al*., 1996) und Elicitoren induzieren.

Pflanzliche Cyt P450 kommen neben dem ER auch in den Chloroplasten vor. Aus dem Genom von *Arabidopsis* sind 20 Gene bekannt, die am N-Terminus einen hohen Anteil an Ser/Thr haben, was ein Indikator für eine Verankerung in Chloroplasten ist (Watson *et al*., 2001). Aus Chloroplasten wurden bisher vier Cyt P450 isoliert, nämlich die Allenoxidsynthase (AOS; CYP74A; EC 4.2.1.92; Song *et al*., 1993), die Hydroperoxidlyase (HPL; CYP74B; Matsui *et al*., 1996), die *ent*-Kauren-Oxidase (CYP701A3; Helliwell *et al*., 2001) und CYP86B1, dessen Funktion noch nicht bekannt ist (Watson *et al*., 2001). Die AOS und HPL sind beide am Fettsäuremetabolismus beteiligt, die *ent*-Kauren-Oxidase an der Gibberelinsäurebiosynthese. Diese Enzyme unterscheiden sich in einigen Merkmalen von mikrosomalen Cyt P450. So benötigt die AOS zur Reaktion keinen Sauerstoff und unterscheidet sich daher signifikant in ihrer I-Helix-Struktur (Song *et al*., 1993). Des Weiteren haben die Enzyme je nach Importmechanismus in die Chloroplasten typische N-terminale Transitsequenzen aus 40-60 Aminosäuren, die nach der Translokation wieder abgespalten werden (Froehlich *et al*., 2001). Die Sequenzen von Cyt P450 aus den Chloroplasten unterscheiden sich insgesamt deutlich von den mikrosomalen Cyt P450. Auf sie soll jedoch nicht näher eingegangen werden, da sie in der Furanocumarinbiosynthese ohne Bedeutung sind.

1.4.5 Die Bedeutung der Cyt P450 für den Menschen

Im Menschen sind Cyt P450 bei der Entgiftung von Medikamenten und am Abbau anderer Stoffe (Fettsäuren, Hormone etc.) in der Lebe beteiligt. Außerdem katalysieren sie die Bildung von wichtigen Stoffen wie den Steroidhormonen, Gallensäuren und Thromboxanen.

Cyt P450 aus den Familien 1, 2 und 3 sind von großer Bedeutung im oxidativen Phase-1-Metabolismus von Arzneistoffen. Jedes zweite durch Cyt P450 metabolisierte Arzneimittel ist Substrat der CYP3A-Subfamilie (Martin-Facklam *et al.*, 2000), die ca. 30 % aller Cyt P450 der Leber ausmacht (Schwab *et al.*, 2002). CYP3A4/5 bauen zum Beispiel wichtige Medikamente wie Amitriptylin, Carbamazepin, Erythromycin, Clarithromycin, Ciclosporin, Nifedipin und Terfenadin ab. Diese Beispiele machen deutlich, dass die Leberenzyme keine hohe Substratspezifität zeigen, wie es bei pflanzlichen Cyt P450 der Fall ist.

CYP1A1/2	CYP2B6	CYP2C9	CYP3A4/5
Clozapin	Cyclophosphamid	Celecoxib	Ciclosporin
Coffein	Clopidogrel	Diclofenac	Cyclophosphamid
Theophyllin	Bupropion	Ibuprofen	Erythromycin
		Phenytoin	Nifedipin
		Tolbutamid	Midazolam
		Warfarin	Tamoxifen
		Sulfonylharnstoffe	Benzodiazepine
			Statine

Tab. 1: Ausgewählte Beispiele von durch Cyt P450 metabolisierten Arzneistoffen

Daneben hat eine Vielzahl von Arzneistoffen durch ihre Wirkung auf Cyt P450 ein hohes Interaktionspotential. Bekannte Cyt P450-Inhibitoren sind unter anderem Proteasehemmer der HIV-Therapie, Makrolid-Antibiotika (z. B. Erythromycin) und Antimykotika (z. B. Ketoconazol). Bekannte Cyt P450-Induktoren sind Carbamazepin, Phenobarbital, Phenytoin und Rifampicin.

Auch Pflanzen metabolisieren mit Cyt P450 Fremdstoffe. So haben viele die Fähigkeit mittels Cyt P450 Herbizide zu entgiften (Siminszky *et al.*, 1999; Werck-Reichhart *et al.*, 2000). Viele Herbizide werden durch Hydroxylierung abgeabut. So kann das Herbizid Prosulfuron durch Hydroxylierung oder O-Demethylierung entgiftet werden, Diclofop durch Hydroxylierung an drei verschiedenen Positionen und Chlorsulfuron durch die Chlorsulfuron-5-hydroxylase. Um Pflanzen resistenter gegen bestimmte Herbizide zu machen, müssten diese

daher mit dem entsprechenden Enzym transformiert werden. Außerdem kann man in der Pflanzenzüchtung Cyt P450 zum Verändern von Blütenfarben, zur Beeinflussung des Wachstums und der Reifung verwenden.

In der Industrie werden Cyt P450 unter anderem zur Produktion von Arzneistoffen eingesetzt (Guengerich, 2002). Hier ist die Herstellung von Cortison aus Progesteron durch 11α-Hydroxylierung in *Rhizopus*-Kulturen zu nennen (Peterson *et al*., 1952). Ein weiteres Beispiel ist die 6β-Hydroxylierung in *Mucor hiemalis* von Compactin zum HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Pravastatin (Serizawa *et al*., 1983). Da bei der Biosynthese von vielen Antibiotika Cyt P450 beteiligt sind, könnte ein Ziel für die Zukunft die Synthese von neuen Antibiotika in Bakterien sein.

1.4.6 Die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase

Die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) liefert zwei Elektronen von NADPH/NADH an das Cyt P450, den terminalen Akzeptor der mikrosomalen Elektronentransportkette. Interaktionen zwischen der CPR und dem Cyt P450 erfolgen über elektrostatische Wechselwirkungen. So hat die CPR viele Carboxylgruppen und Cyt P450 sind Dipole mit der positiven Ladung an der proximalen Seite.

Es sind bereits mehrere CPRs aus Pflanzen gereinigt und kloniert worden. In Säugetieren und Hefen gibt es wie auch in *Catharanthus roseus* (Meijer *et al*., 1993), *Vigna radiata* (Shet *et al.*, 1993) und *Papaver somniferum* (Rosco *et al*., 1997) nur eine CPR. In anderen Pflanzen kommen mehrere CPRs vor. So wurden zum Beispiel aus *Helianthus tuberosus* die HTR1 (2,4 kb) und HTR3 (2,6 kb) (Lesot *et al.*, 1995), aus *Arabidopsis thaliana* die ATR1 (2,1 kb) und ATR2 isoliert (Urban *et al*., 1997). Die beiden CPRs aus *Arabidopsis* sind keine nahen allelischen Varianten, denn die Aminosäuresequenzen haben nur 64 % Ähnlichkeit, und die ATR2 ist der HTR1 und HTR3 ähnlicher als der ATR1. Die ATR2 wird durch Verwundung und Licht induziert, wobei das Induktionsmuster der ATR2 eng dem der PAL1 und des CYP73A5 folgt (Mizutani und Ohta, 1998). Eine vermutete Koordination mit der PAL und der C4H wird durch zwei in allen drei Enzymen ähnlichen *cis*-aktiven Elementen im Promotor verstärkt.

Aus Pappelhybriden (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) sind drei CPRs isoliert worden, die Ro *et al*. (2002) nach ihren N-terminalen Sequenzen in zwei Klassen einteilen. CPRs der Klasse I (*Papaver somniferum*, *Vigna radiata*, *Vicia sativa*) haben eine kurze N-terminale Sequenz, CPRs der Klasse II (Pappel CPR2/3, CPR1 aus *Petroselinum crispum*, CPRs aus Tabak, Erbse, *Catharanthus roseus*) dagegen eine lange.

Durch Klonierung der CPRs aus verschiedenen Organismen und durch die Kristallisation einer CPR aus Rattenleber (Wang *et al*., 1997) ist viel über die Struktur und Sequenzmotive bekannt. Bei allen ist ein hydrophober N-Terminus zur Verankerung in der Membran vorhanden, wohingegen der C-Terminus hydrophiler ist. Daneben gibt es Bindungsdomänen für die Elektronenakzeptoren Cyt P450 und Cytochrom C. Konserviert sind auch die Bindungsdomänen für die Kofaktoren FMN, FAD und NADPH. Das FMN bindet über den Phosphattteil und zweimal über den FMN-Ring, das FAD über das Adenin, das Pyrophosphat und zweimal über den Ring. Die NADPH-Bindungsdomänen dienen der Bindung von NADPH über das Pyrophosphat und das Adenin. Die Interaktion mit dem Cyt P450 erfolgt über zwei acide Regionen (Shen und Kasper, 1995).

Bisher sind nur mikrosomale CPRs isoliert worden. Da die Gibberelinbiosynthese zumindest teilweise in den Chloroplasten abläuft und die *ent*-Kauren-Synthase in den Chloroplasten lokalisiert ist, stellt sich die Frage, ob CPRs auch in Chloroplasten vorkommen. Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* konnte keine CPR gefunden werden. Wenn man diese Pflanze als Modell nimmt, müsste man davon ausgehen, dass auch in anderen Pflanzen keine CPR in den Chloroplasten vorkommt. Stattdessen könnten Ferredoxin und die Ferredoxin-Reduktase die Funktion übernehmen.

1.4.7 „Mechanism-based enzyme inactivation" von Cyt P450

Gewöhnlich entstehen im Reaktionszyklus von Cyt P450 aus den Substraten für das Enzym unschädliche Produkte. Bei manchen Substraten können die Reaktionen jedoch über hochreaktive intermediäre Radikale verlaufen, die leicht Nebenreaktionen auslösen können. Diese Nebenreaktionen, wie zum Beispiel Fragmentierung oder Substitution des Häms, können zu einer Hemmung des Enzyms führen. Solche Substrate werden also durch Enzymkatalyse umgewandelt und Suizid-Substrate (Mechanism based inactivators, MBIs) genannt. Für die Bildung des Inhibitors ist NADPH notwendig.

Die Inaktivierung kann über drei verschiedene Mechanismen erfolgen (Osawa und Pohl, 1989): (a) Bindung des MBI an das Häm, (b) Bindung des MBI an das Apoprotein, oder (c) Fragmentierung des Häm zu Produkten, die kovalent an das Apoprotein binden. Bei Mechanismus (b) wird vermutet, dass die Bindung als Carben am Eisen des Häms erfolgt (Mansuy *et al*., 1997).

Es sind viele Suizid-Inhibitoren von Cyt P450 bekannt. Unter den Furanocumarinen sind zum Beispiel das 5- (5-MOP) und 8-Methoxypsoralen (8-MOP) als Inhibitoren von CYP2A6 (Koenigs *et al.*, 1997) und CYP2B1 (Koenigs und Trager, 1998b) aus der

menschlichen Leber und von Cyt P450 aus der Ratte (Letteron *et al*., 1986) von Bedeutung. CYP2A6 kodiert die 7-Hydroxylase, die unter anderem Nicotin und Aflatoxin B_1 metabolisiert. Der Mechanismus der Inaktivierung wurde wie folgt postuliert (Koenigs und Trager, 1998a, 1998b). Initial wird der Furanring zum Epoxid (8-MOP, 5-MOP, Psoralen) oder γ-Ketoenal oxidiert, die dann mit Wasser zum Dihydrol reagieren oder direkt an eine nucleophile Aminosäure des aktiven Zentrums von CYP2A6 binden.

Auch pflanzliche Cyt P450 werden durch MBIs gehemmt. Die potentesten Suizid-Inhibitoren der C4H sind Piperonylsäure (*trans*-3-(Pyrid-4-yl)-acrylsäure; Schalk *et al*, 1998) und 2-Hydroxy-1-Naphthoat. Beide Inhibitoren wirken nur quasi-irreversibel, wobei Piperonylsäure ein reversibler kompetitiver Inhibitor ist. Sie hemmt über eine Koordination des Eisens am Häm. Ein irreversibler Inhibitor ist 2,4-Dichlorophenoxypropyne (Pierrel *et al*., 1994).

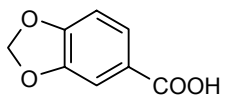


Abb. 19: Piperonylsäure

1.5 Die Zimtsäure 4-Hydroxylase

Die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11), die zur Superfamilie der Cyt P450 gehört, ist ein Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels. Als zweites Enzym des generellen Phenylpropanwegs katalysiert sie die Umsetzung von *trans*-Zimtsäure zu *trans*-4-Cumarsäure. Als erstes pflanzliches Cyt P450 wurde sie 1993 aus *Helianthus tuberosus* kloniert (Teutsch *et al*., 1993). Inzwischen sind die Sequenzen von vielen weiteren C4Hs aus verschiedenen Pflanzen bekannt, wie zum Beispiel *Petroselinum crispum* (Koopmann *et al*., 1999), *Medicago sativa* (Fahrendorf und Dixon, 1993), *Populus*-Hybriden (Ro *et al*., 2001), *Pisum sativum* (Frank *et al*., 1996), *Vigna radiata* (Mizutani *et al*., 1993) und *Lithospermum erythrorhizon* (Yamamura *et al*., 2001). Sie kommt vermutlich in allen Pflanzen und in fast allen Geweben vor (Durst *et al*., 1996). Bell-Lelong *et al.* (1997) wiesen die Expression in allen vaskulären Geweben von Stiel, Wurzel und Blättern nach. Als subzelluläre Lokalisation wurde bei der Pappel das ER beschrieben (Ro *et al.*, 2001), bei *Phaseolus vulgaris* das ER und der Golgiapparat (Smith *et al*., 1994). In einer Untersuchung der Substratspezifität konnte kein weiteres physiologisches Substrat entdeckt werden (Schalk *et al.*, 1997).

Die C4Hs, die alle zur Familie CYP73 gehören, gruppiert man nach ihrer Sequenzhomologie in Typ I und Typ II (Nedelkina *et al*, 1999). Bei einigen Pflanzen wie zum

Beispiel *Zea mays* (CYP73A8), *Phaseolus vulgaris* (CYP73A15), *Mesembryanthemum crystallinum* (CYP73A22), *Nicotiana tabacum* (CYP73A27 und CYP73A22) und *Citrus sinensis* (CYP73A29) zeigen die Proteinsequenzen der C4Hs (Typ I) nur 60 % Homologie zu den bisherigen C4Hs (Typ II), wohingegen die Proteinsequenzen der C4Hs Typ II untereinander normalerweise eine Homologie von ungefähr 80-90 % aufweisen.

1.6 Regulation der Enzyme des Phenylpropanwegs

Die Aktivitäten der Eingangsenzyme des Phenylpropanstoffwechsels PAL und C4H haben vermutlich großen Einfluss auf die Syntheseraten der verschiedenen Phenylpropane, und die PAL wurde z. B. als „rate-limiting“ postuliert. Viele Phenylpropanderivate haben als Phytoalexine oder zur Zellwandverstärkung große Bedeutung in der pflanzlichen Pathogenabwehr, so dass nach Infektion der Kohlenstofffluss in den Phenylpropanweg reguliert werden muss. Die Regulation der Schlüsselenzyme findet auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene statt.

Die meisten Arbeitsgruppen haben transgenen Tabak als Untersuchungsmodell für die Regulation des Phenylpropanwegs gewählt. Hinsichtlich der Bedeutung der einzelnen Enzyme bei der Regulation des Phenylpropanwegs gibt es kontroverse Meinungen. Anterola *et al*. (2002) halten die Verfügbarkeit von Phenylalanin und die Modulation der C4H und C3H für die regulierenden Faktoren des Kohlenstoffflusses in Richtung Lignin. Die koordinierte Heraufregulation der anderen Enzyme infolge des erhöhten Angebots an Phenylalanin ist dann eine Modulation in Folge des metabolischen Bedarfs. Die Arbeitsgruppe von Blount *et al.* (2000; Sewalt *et al*., 1997) postuliert dagegen eine Regulation über einen „feedback loop“, was bedeutet, dass die PAL über ihr Produkt, also Zimtsäure, gehemmt und reguliert wird. Die *trans*-Zimtsäure wirkt dann als negativer feedback Modulator auf die Expression und die Enzymaktivität der PAL. Dies wurde an transgenen Tabak-Zelllinien mit herunterregulierter C4H bewiesen. In Pflanzen mit reduzierter Expression der C4H verhielten sich die Aktivitäten der C4H und der PAL proportional zueinander, eine reduzierte PAL-Aktivität bewirkte jedoch keine reduzierte C4H-Aktivität. Auch Lamb (1979) und Bolwell *et al.* (1986) haben festgestellt, dass exogen verabreichte Zimtsäure die PAL-Aktivität und die Transkription der PAL-Gene inhibiert und die Synthese von einem Proteininhibitor der PAL induziert. Diese Form der Kontrolle könnte auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene stattfinden (Dixon und Paiva, 1995).

Auch auf transkriptioneller Ebene ist die Regulation des Phenylpropanwegs studiert worden, indem *cis*-aktive Elemente in den Promotoren und die bindenden

Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden. Als Auslöser einer vermehrten Expression der Enzyme sind neben Pathogenen auch chemische Induktoren wie zum Beispiel 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, verschiedene Herbizide, Phenobarbital, Ethanol und Mangan-Ionen (Durst *et al*., 1996) bekannt. Bei der Signalübertragung nach der Induktion spielen Proteinkinasen eine wichtige Rolle. Allwood *et al*. (1999) haben eine Kinase aus induzierten Suspensionskulturen von *Phaseolus vulgaris* partiell gereinigt, die vermutlich zur Familie der CDPK (Calcium abhängige Proteinkinasen) gehört. Diese phosphoryliert die PAL und moduliert so ihre Aktivität. Wie schon bei der Pflanzenabwehr beschrieben, wirken diese Kinasen meist auf Transkriptionsfaktoren, die wiederum durch Bindung an Promotorsequenzen der Enzyme des Phenylpropanwegs deren Genaktivität modulieren. Es sind verschiedene Promotorsequenzelemente bekannt, die in allen Schlüsselenzymen des Phenylpropanwegs vorkommen (Leyva *et al*., 1992; Whitbred und Schuler, 2000; Tamagnone *et al.,* 1998). Als Folge nimmt die Transkriptmenge zum Beispiel der PAL und der C4H (Werck-Reichhart, 1995; Durst *et al*., 1996) zu. In *Medicago sativa* gibt es 5-10 PAL-Gene, von denen mindestens zwei im Laufe der Abwehr induziert werden (Pellegrini *et al*., 1994).

Aus mehreren Pflanzen sind Myb-Transkriptionsfakoren isoliert worden, die in den Phenylpropanweg regulierend eingreifen. *Myb*-Gene stellen die größte Gruppe der Gene für Transkriptionsfaktoren in Pflanzen dar. So sind zum Beispiel in *Arabidopsis thaliana* um die 100 verschiedene *myb*-Gene identifiziert worden (Kranz *et al*., 1998). AmMYB305 und AmMYB340 aus *Antirrhinum majus* aktivieren die PAL (Moyano *et al*., 1996; Tamagnone *et al*., 1998). Von MYB305 ist bekannt, dass die Aktivierung durch die Bindung an die P-Box (AACCTAAC) im Promotor der PAL geschieht (Moyano *et al*., 1996). Außerdem wurde AtMYB4 aus *Arabidopsis thaliana* entdeckt (Jin *et al*., 2000), das ortholog zu AmMYB308 ist (Hemm *et al*., 2001). Die Transkriptionsfaktoren dieser Gene bewirken als Repressoren beide eine Verminderung der Transkripte der C4H, der 4CL (4-coumaroyl:CoA ligase) und der CAD (Cinnamylalcohol dehydrogenase), wobei die C4H der primäre Angriffspunkt ist. Bei UVB Exposition der Pflanze wird AtMYB4 herunterreguliert, so dass die Synthese von schützenden Phenylpropanderivaten steigt. Dies wird bei einer AtMYB4-Mutante deutlich, die mehr Sinapinsäureester produziert, wodurch sie toleranter gegenüber UV-B-Strahlung ist. NtMYBAS1 aus *Nicotiana tabacum* bindet an 2 PAL-Gene aus Tabak und ist dagegen ein positiver Regulator (Yang *et al*., 2001).

Kenntnisse über die genaue Regulation der Enzyme des Phenylpropanwegs sind aus mehreren Gründen von Interesse. Zum einen könnte ein Eingreifen in die Regulation, zum Beispiel über „mechanism-based inhibition“ der C4H mit Piperonlysäure (Schalk *et al*.,

1998), zur weiteren Untersuchung des Phenylpropanwegs besonders im Hinblick auf die Biosynthese von Benzoesäure und Salicylsäure ausgenutzt werden. Zum anderen könnte eine Modulation des Phenylpropanwegs ebenfalls für den Menschen von großer Bedeutung sein. So stellt zum Beispiel die C4H einen idealen Angriffspunkt zur Veränderung der Lignifizierung oder der Abwehrreaktionen in Pflanzen dar (Schalk *et al*., 1997). Eine Reduktion des Ligningehaltes könnte in der Papierindustrie den Einsatz von Chemikalien stark reduzieren. Auch in der Landwirtschaft wäre es von Vorteil, da Viehfutter für das Vieh leichter verdaulich wäre.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Psoralene haben eine Reihe von unerwünschten Bioaktivitäten. Seit langer ist Zeit bekannt, dass Psoralene Kontaktdermatitiden auslösen können (Berkley *et al*., 1986). Zudem führt die Photosensibilisierung zu kovalenten DNA-Addukten mit der Gefahr von carzinogenen und mutagenen Auswirkungen. Daneben sind Psoralene auch als Suizidinhibitoren für Cyt P450 beschrieben worden. Problematisch ist, dass einige Pflanzen, die in unserer Ernährung eine Rolle spielen, nennenswerte Mengen an Psoralenen enthalten, und im Falle von Sellerie wurde sogar eine Steigerung bei Luftverschmutzung beobachtet (Coviella *et al*., 2001). Vor diesem Hintergrund wäre eine Kontrolle der Psoralen-Akkumulation erwünschenswert.

Der Biosyntheseweg und der Typus der beteiligten Enzyme wurden durch Vorstufenexperimente und *in vitro* Studien aufgeklärt (Hamerski und Matern, 1988a und b; Hamerski *et al*., 1990). Beteiligt sind mindestens fünf Cyt P450, die sequentiell Zimtsäure zu Bergaptol oder Xanthotoxol umsetzen (Zimtsäure 4-Hydroxylase, Marmesinsynthase, Psoralensynthase, Psoralen-5-monooxygenase, Xanthotoxol-8-monooxygenase); die Aktivitäten dieser Enzyme können in Zellkulturen von *Petroselinum crispum* oder *Ammi majus* durch pilzlichen Elicitor induziert werden. Unklar ist noch, ob die Bildung des Umbelliferons über eine *ortho*-Hydroxylierung erfolgt. Falls dies der Fall ist, käme hier ebenfalls eine Katalyse durch ein Cyt P450 in Frage. Das Ziel der weiteren Forschung liegt auf der genetischen Ebene und betrifft die Struktur und letztlich die Regulation der beteiligten Gene.

Da eine klassische Reinigung bei den membrangebundenen Cyt P450 schwierig ist, sollte ein direkter Zugang über die Klonierung induzierbarer Cyt P450 gewählt werden - in der Hoffnung auch solche Enzyme zu klonieren, für die es bisher keine Präzedenzen gibt. In der jüngsten Zeit sind Methoden entwickelt worden, die die differentielle Klonierung von Cyt P450 erlauben. Mit Hilfe dieser Methoden sollten aus *Ammi majus* so viele Cyt P450 wie

möglich kloniert werden, wobei die Induktion durch Elicitoren als differentielles Auswahlkriterium herangezogen wurde. Unter diesen Bedingungen sollten auch - oder sogar bevorzugt - solche Cyt P450 amplifiziert werden, die an der Psoralen-Biosynthese beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid	Promega (Mannheim)
Adenin	Roth (Karlsruhe)
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Bacto-Agar	Difco Lab (Detroit, USA)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Caseinhydrolysat	ICN Biomedicals (Meckenheim)
Cytochrom C	Roth (Karslruhe)
D (+)-Galactose	Roth (Karslruhe)
Deoxyribonucleic Acid for Hybridization (Salmon testes)	Sigma (Deisenhofen)
Desoxycholsäure	Roth (Karlsruhe)
DNA -Größenstandards	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
dNTPs	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DTT	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ficoll Typ 400	Sigma (Deisenhofen)
Formaldehyd	Sigma (Deisenhofen)
Formamid	Sigma (Deisenhofen)
GeneRuler 1 kp DNA-Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 50 bp DNA-Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Glassbeads ∅ 425-500	Sigma (Deisenhofen)
Glykogen für die Molekularbiologie	Roche Diagnostics (Mannheim)
Guanidiniumthiocyanat	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Hybond N+ (positively charged nylon membrane)	Amersham (Braunschweig)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
Natriumsarcosinat	Sigma (Deisenhofen)
Nusieve GTG Agarose 3%	Biozym (Hamburg)
PEG 4000	Roth (Karlsruhe)
Pepton aus Casein	Roth (Karlsruhe)
Phenol, gesättigt mit 0,1 M Citrat-Puffer	Sigma (Deisenhofen)
Pmg-Elicitor	Sammlung des Institutes
Polyacrylamid-Gebrauchslösung	Promega (Mannheim)
Polyethylenglycol 4000	Roth (Karlsruhe)
Rinderserumalbumin (BSA), FraktionV	Serva (Heidelberg)
Roti®-Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Select Agar	GibcoBRL (Eggenstein)
Spermidin	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Tetracyclin	Roth (Karlsruhe)
Tryptophan	Sigma (Deisenhofen)

TWEEN 20	Sigma (Deisenhofen)
Whatman 3MM Chr	Whatman (Banbury, UK)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)
Xylencyanol	Sigma (Deisenhofen)
Yeast Nitrogen Base	Sigma (Deisenhofen)

Alle weiteren Chemikalien sind in p.a.Qualität von Roth und Sigma bezogen worden.

2.1.2 Radiochemikalien

Substanz	Spezifische Aktivität	Bezugsquelle
[α-^{35}S]dATP	~ 1.000 Ci/ mmol	ICN (Meckenheim)
[U-^{14}C] L-Phenylalanin	396 mCi/ mmol	Hartmann (Braunschweig)
[U-^{14}C]Zimtsäure	46,3 mCi/ mmol	CEA (France)
[3-^{14}C]Marmesin		Sammlungen des Instituts
[3-^{14}C]Demethylsuberosin		Sammlungen des Instituts
[7-^{14}C]Salicylsäure	56 mCi/ mmol	Hartmann (Braunschweig)
[α-^{32}P]dCTP	> 3000 Ci/ mmol	ICN (Meckenheim)
[carboxyl^{14}C]-4-Hydroxybenzoesäure	55 mCi/ mmol	Hartmann (Braunschweig)

2.1.3 Substrate und Kosubstrate

trans-4-Cumarsäure	Sigma (Deisenhofen)
trans-Zimtsäure	Sigma (Deisenhofen)
4-Cumarsäuremethylester	Synthese durch Edgar Specker
NADPH	Roche Diagnostics (Mannheim)

2.1.4 Enzyme

DNase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Expand High Fidelity	Roche Diagnostics (Mannheim)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
MMLV Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Rhodutorula glutinis PAL	Sigma (Deisenhofen)
RNase A	Roth (Karlsruhe)
RNase H	Roth (Karlsruhe)
Superscript II RT	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Taq DNA Polymerase	Promega (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.5 Reaktionssysteme und Kits

Concert Rapid Plasmid Miniprep System	GibcoBRL (Eggenstein)
DIG High Prime	Roche Diagnostics (Mannheim)
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Dynabeads mRNA Direct Kit	Dynal Biotech (Hamburg)

GeneRacer Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences (Braunschweig)
NucleoTrap®	Macherey-Nagel (Düren)
pYES2.1 TOPO TA Expression Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)
QuikChange® Multi Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Heidelberg)
Rediprime II DNA Labeling System	Amersham Biosciences (Braunschweig)
Rneasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
S. c. EasyComp Transformation Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Ultrafree-DA / DNA Extraction from Agarose Gels	Millipore (Schwalbach)

2.1.6 Bakterien- und Hefestämme

2.1.6.1 *E.coli*

Stamm	Genotyp	Hersteller
TOP 10	F^-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) θ80lac ZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rps (Str^r) endA1 nupG	Invitrogen (Leek, Niederlande)
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15Tn10 (Tetr)]	Stratagene (Heidelberg)
XL10-Gold	TetR Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F´ proAB laclqZΔM15 Tn10 (TetR) Amy CamR]	Stratagene (Heidelberg)

2.1.6.2 Hefe

Stamm	Genotyp	Hersteller
INV Sc1	(*MAT*α, *his* 3Δ1, *leu*2, *trp*1-289, *ura*3-52 / *MAT*α, *his* 3Δ1, *leu*2, *trp*1-289, *ura*3-52)	Invitrogen (Leek, Niederlande)

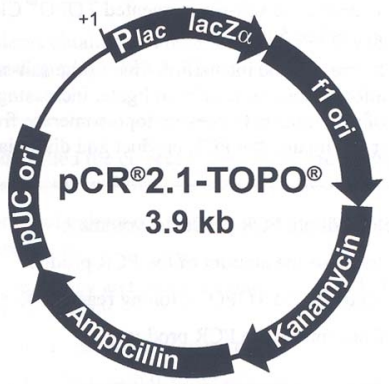
Dieser Stamm ist diploid und besitzt nur eine endogene NADPH-Cytochrom P450 Reduktase-Aktivität (CPR).

Die Stämme W(N), WAT11, WAT21 sowie der Expressionsvektor pYeDP60 wurden von D. Pompon (Gif-sur-Yvette, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Der Hefestamm W(N) (entspricht W303-1B, *MAT*α; *ade* 2-1; *his* 3-11; *leu* 2-3; *ura* 3-1; *trp* 1; $can^{R.}$; cyr^+) wurde am YRED-Locus so verändert, dass die folgenden Stämme WAT11 und WAT21 die ATR1 bzw. ATR 2 aus *Arabidopsis* überexprimieren. ATR1 und ATR2 kodieren die CPRs in *Arabidopsis*.

2.1.7 Vektoren

2.1.7.1 *E. coli*-Vektoren

pCR2.1-TOPO TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande)
pCR4-TOPO Generacer Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande)



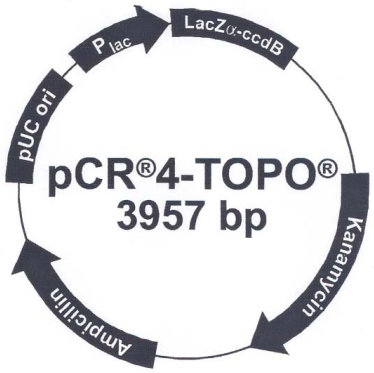


Abb. 20: *E. coli*-Vektoren: pCR2.1-TOPO (Invitrogen) und pCR4-TOPO (Invitrogen)

2.1.7.2 Hefeexpressionsvektoren

Die Expression der klonierten Cytochrom P450 Gene wurde mit zwei verschiedenen Hefevektoren durchgeführt. Bei pYES2.1/V5-His-TOPO® (Invitrogen, Niederlande) handelt es sich um einen linearisierten Vektor mit überhängenden Deoxythymidinen zur direkten Klonierung von PCR-Produkten mit überhängenden Adenosinen. Außerdem verfügt er über ein V5 Epitop und eine Polyhistidin-Region, welche die Isolierung des klonierten Gens erleichtern soll. Der Vektor hat außerdem ein Ampicillinresistenzgen und kann in Hefen und E.coli vermehrt werden.

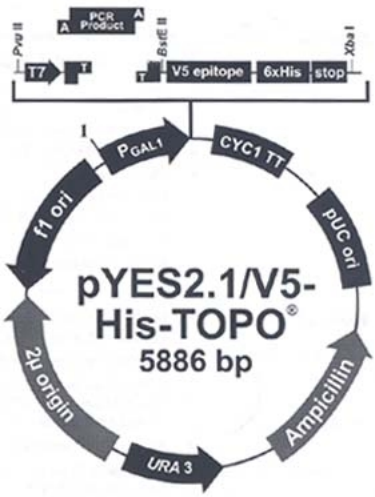


Abb. 21: Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen)

Außerdem wurde der Hefeexpressionsvektor pYeDP60 (Urban *et al*., 1990; Pompon *et al*., 1996) verwendet. Der Vektor verfügt über einen *URA*3- und einen *ADE*2-Komplementationsmarker, wodurch eine Selektion der transformierten Hefen auf Adenosin freiem Medium möglich wird. Der GAL10-CYC1 Hybrid Promotor ist durch Galaktose induzierbar. Als Terminator dient der PGK-Terminator (Phosphoglycerat-Kinase).

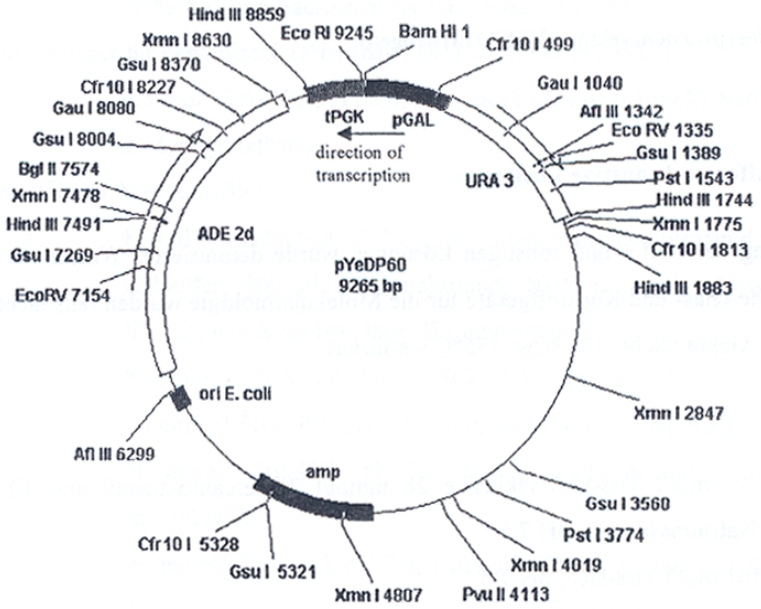


Abb. 22: Hefeexpressionsvektor pYeDP60

2.1.8 Puffer und sonstige Lösungen

Puffer und Lösungen zur RNA-Isolierung

Extraktionspuffer RNA-Isolierung Methode A:

100mM Tris-HCL-Puffer pH 8,0 mit 2 % CTAB, 2 % PVP K30, 25 mM EDTA und 0,5 g/l Spermidin; nach dem Autoklavieren Zusatz von 2 % ß-Mercaptoethanol.

Extraktionspuffer RNA-Isolierung nach Giuliano Methode B

50 g Guanidiniumthiocyanat, 5 ml 3 M Natriumacetat, pH 5,3, 2 ml Natriumsarcosinat 10 % auffüllen mit Aqua dest. ad 100 ml

Puffer und Lösungen für die DD-RT-PCR

5x TBE-Puffer pH 8,3

1 M Tris, 0,83 M Borsäure, 10 mM EDTA

Formamid Ladepuffer

80 % Formamid, 10 mM EDTA pH 8,0, 1 mg /ml Xylencyanol FF, 1 mg /ml Bromphenolblau

Puffer und Lösungen zur Isolierung von DNA

Methode A:

Lösung 1

25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 5 mM Glucose

Lösung 2

0,2 N NaOH, 1% SDS

Lösung 3

5 M Kaliumacetat, pH 4,8

Methode B:

GTE-Puffer

25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,02 mg/ml RNase, 50 mM Glucose

Lyselösung

0,2 N NAOH, 1 % SDS (w/v)

Lösung 3

5 M Kaliumacetat, pH 4,8

Puffer und Lösungen zur Isolierung von genomischer DNA (Dellaporta *et al.*, 1983)

Extraktionspuffer

100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM 2-Mercaptoethanol

10 TE

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

50 TE

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

5 M Kaliumacetat

3 M Natriumacetat

20 % SDS pH 7,2

Puffer und Lösungen zum Dot-Blot

20x SSC

3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, mit 10 N NaOH auf pH 7,0 einstellen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

10x MOPS pH 6,0

200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA

Denhardt`s Reagent 50x

0,5 g Ficoll Typ 400, 0,5 g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g Rinderserumalbumin

Puffer und Lösungen zur Expression in Hefe

TEK

50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1 mM KCl

TES-B

50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,6 mM Sorbitol, 2 mM DTT

TEG

50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 20 % (V/V) Glycerin

Sonstige Puffer und Lösungen

Lowry A

0,1 N NaOH mit 0,5 % SDS und 2 % Na_2CO_3

TE-Puffer, pH 8,0

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

TE-Puffer pH 7,5

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

50x TAE-Puffer

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

2.1.9 Medien

2.1.9.1 Bakterienmedien

LB (Luria Bertani):	10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 1 ml 1M $MgSO_4$, 4 ml Glycerol 50 % (v/v) ad 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen , pH 7,5 einstellen, autoklavieren
LB-Agarplatten:	Pro Liter LB-Medium 15 g (1,5 %) Bacto-Agar
SOC:	20 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 20 mM Glucose

2.1.9.2 Hefemedien

SGI:	1 g/l Pepton, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base, 0,02 g/l Tryptophan, 20 g/l Glucose
YPGA:	10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 20 g/l Glucose, 0,2 g/l Adenin
YPGE:	10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 5 g/l Glucose, 3 % Ethanol

2.1.9.3 Zellkulturmedien

B5:	2 ml Na_2HPO_4 x H_2O-Stammlösung 20 ml KNO_3-Stammlösung 2 ml $(NH_4)_2SO_4$-Stammlösung 2 ml $MgSO_4$ x 7 H_2O-Stammlösung 1 ml $CaCl_2$ x 2 H_2O-Stammlösung 1 ml KJ-Stammlösung 5 ml FeEDTA -Stammlösung 1 ml Vitamin-Stammlösung 10 ml 2,4-D-Stammlösung 1 ml Spurenelemente 20 g Sucrose auffüllen mit Aqua dest. ad 1 l und auf pH 5,5 einstellen
B5+:	wie B5 nur, zusätzlich 2 ml Kinetin-Stammlösung 200 mg Cystein 10 ml 2,4-D Stammlösung

Stammlösungen:

Na_2HPO_4 x H_2O	75g/l
KNO_3	125 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	67 g/l
$MgSO_4$ x 7 H_2O	125 g/l
$CaCl_2$ x 2 H_2O	171 g/l
KJ	0,75 g/l
FeEDTA	1390 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O und 1860 mg Na_2EDTA getrennt in Aqua dest. lösen und ad 500 ml auffüllen mit Aqua dest.
Spurenelemente	1120 mg $MnSO_4$ x H_2O 300 mg H_3BO_3 300 mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O 25 mg $NaMoO_4$ x 2 H_2O 39 mg $CuSO_4$ x 5 H_2O

	25 mg $CoCl_2$ x 6 H_2O
	ad 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
Vitamine	50 mg Nicotinsäure
	50 mg Pyridoxin-HCl
	50 mg Thiamin-HCl
	5000 mg myo Inosit
	ad 50 ml auffüllen mit Aqua dest.
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	50 mg in etwas Ethanol lösen und mit Aqua dest. ad 500 ml auffüllen
Kinetin	10 mg in 100 ml 0,1 N HCl lösen

Festmedien wurden analog mit 1% Agar hergestellt.

2.1.10 Dünnschichtplatten und Laufmittel

Dünnschichtplatten:

Kieselgel 60 F_{254}	Merck (Darmstadt)
Cellulose ohne Fluoreszenzindikator	Merck (Darmstadt)

Laufmittel:
A: Toluol/ Eisessig: 4/1
B: Cyclohexan/ Ethylacetat: 2:1
C: Chloroform/ Ethylacetat: 2:1
D: 15 % Essigsäure

2.1.11 Geräte

2K15 Zentrifuge	Sigma (München)
Bio Imager FLA-2000	Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)
	Software von Raytest (Straubenhardt)
Gene Quant	Pharmacia (Freiburg)
MiniCycler Model PTC-150	Biozym (Hamburg)
Minifold I- SRc 96- Dot Blot	Schleicher & Schüll (Dassel)
PheroTemp	Biotec Fischer (Reiskirchen)
Robocycler Gradient 96	Stratagene (Amsterdam, NL)
Sorvall®RC 5C Zentrifuge	DuPont (Newton, USA)
Sorvall®RMC14 Tischzentrifuge	DuPont (Newton, USA)
Spektralphotometer UV-1602	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Thermomixer 5336 und 5437	Eppendorf (Hamburg)
Tri-Carb™ Liquid Scintillation Analyzers Mode 1900TR	Packard (Meiden, USA)
Uni Equip Hybridisierungsofen 6/12	Uni Equip (Martinsried)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung des Pflanzenmaterials

2.2.1.1 Anzucht der Zellen

Ammi majus Kalluskulturen wurden aus Saatgut, das zuvor mit Hypochlorit sterilisiert worden ist, angelegt. Nach Keimen unter sterilen Bedingungen wurden die Hypokotyle angeschnitten und auf B5-Agarplatten unter sterilen Bedingungen im Dunkeln gehalten.

Nachdem sich Kallusgewebe gebildet hat, wurde dieses in flüssiges B5+-Medium überführt und wöchentlich in neues Medium umgesetzt. Nach 6 Monaten wurden neue Suspensionskulturen aus dem Kallusgewebe bereitet. Die Suspensionskulturen wurden im Dunkeln bei 25°C und 110 rpm kultiviert.

2.2.1.2 Induktion mit Elicitoren

Die Induktion von 6 Tage alten Suspensionskulturen erfolgte mit Hefeextrakt (Roth) 1% (m/V) bzw. mit rohem *Pmg*-Elicitor (früher *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, neuerdings *P. sojae*), Stammlösung 5mg/ml) mit 5 mg auf 40 ml über eine Zeit von 2 bis 6 Stunden. Die Kontrollen wurden nur mit Wasser behandelt.

2.2.1.3 Ernte

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

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung

2.2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA (Methode A)

200 mg gefrorenes *Ammi majus* Zellmaterial wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gut gemörsert und zu 1 ml Extraktionspuffer gegeben, der zuvor auf 65°C erwärmt worden war. Nach kräftigem Vortexen wurden die Proben 2-3 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden sie für 5-10 Minuten abgekühlt und zweimal mit 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die Oberphase mit 1/4 Volumen 10M LiCl versetzt und die RNA bei 4°C über Nacht gefällt. Am folgenden Tag wurde die RNA bei 4°C und 10000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert, das Pellet in 500 µl SDS 0,5 % bei 65°C unter leichtem Schütteln gelöst und nochmals mit 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Der Überstand wurde mit dem doppelten Volumen absolutem Ethanol versetzt und 2 Stunden bei -20°C belassen. Anschließend wurde 20 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert, das Pellet getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser gelöst. Zur Bestimmung der Qualität wurde die Konzentration mittels UV-Spektrometrie gemessen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die isolierte RNA wurde sofort bei -70°C eingefroren und nach einem Auftauen sofort verwendet.

2.2.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA nach Giuliano (Methode B)

Gesamt-RNA wurde aus Zellkulturen von *Ammi majus* auch nach der Methode von Giuliano *et al*. (1993) isoliert.

Es wurden 500 µl Extraktionspuffer, 3,5 µl 2-Mercaptoethanol (0,7 %), und 400 µl mit Citrat-Puffer gesättigtes Phenol auf Eis vorgelegt. Dazu wurden 200 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Zellkulturmaterial gegeben und durch Vortexen homogenisiert. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde gemischt und der Ansatz für 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und 40 Minuten auf Eis gelassen. Danach wurde erneut für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl TE-Puffer pH 7,5 auf Eis resuspendiert. Dem Ansatz wurden 100 µl absoluter Ethanol zugegeben und bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1/3 Volumen 8 M LiCl versetzt und 60 Minuten auf Eis gehalten. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Pellet zweimal mit je 500 µl Ethanol 80% gewaschen, getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die Konzentration wurde mittels UV-Spektrometrie bei 260 und 280 nm gemessen und die Integrität mit einem Agarosegel geprüft.

2.2.2.1.3 Isolierung von poly(A)$^+$-RNA

Poly(A)$^+$-RNA wurde mit dem Dynabeads mRNA DIRECT™ Kit von Dynal isoliert. Mit dieser Methode kann poly(A)$^+$-RNA aus Gesamt-RNA oder dem Zellrohextrakt gewonnen werden. Die Dynabeads Oligo $(dT)_{25}$ sind magnetische Partikel mit Desoxythymidylat-Seitenketten. Diese binden an das Poly-A-Ende der mRNA und können aufgrund der magnetischen Ladung in einem Magneten (Dynal Biotech, Hamburg) von den restlichen Bestandteilen getrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Die cDNA zum Einsatz in der PCR wurde durch Reverse Transkription von Gesamt-RNA (isoliert nach Giuliano) mittels der MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) hergestellt. Die cDNA für das RACE mit Tailing und für die Herstellung des Templates für die Expression wurde mit der SuperScript™ II (Invitrogen) hergestellt.

Als Primer wurden drei degenerierte Anker Oligo(dT)-Primer (OligoA, C und G) eingesetzt. Dadurch wird nur mRNA umgeschrieben und gleichzeitig die cDNA in drei Untergruppen eingeteilt.

5 µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µl Primer 25 pmol Anker Oligo (dT) versetzt, mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 17,75 µl gebracht, für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 5 µl MMLV 5x Reaktionspuffer und 1,25 µl 10 mM dNTPs wurde für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl MMLV-RT (200 U/µl) zugegeben und für 1 Stunde bei 42°C inkubiert.

Bei der Reversen Transkription mit der SuperScript™II werden 1-5 µg RNA mit 2,5 pmol Primer in einem Endvolumen von 15,5 µl bei 70°C für 10 Minuten denaturiert und anschließend 1 Minute auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2,5 µl 10x Puffer, 2,5 µl 25 mM $MgCl_2$, 1 µl 10mM dNTPs und 2,5 µl 0,1 M DTT wird eine Minute bei 42°C inkubiert. Anschließend wird 1 µl SuperScript™II zugegeben und für 50 Minuten bei 42°C belassen. Die Reaktion wird durch 15 Minuten Inkubation bei 70°C beendet und die nicht umgeschriebene mRNA wird mit 1 µl RNase H bei 37°C verdaut.

2.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.2.2.3.1 Synthese von Oligonukleotiden

Die im Laufe der PCR angewendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech hergestellt.

2.2.2.3.2 Standard PCR

Die Ansätze der Standard-PCR hatten ein Volumen von 50 µl und enthielten 1 x Polymerasepuffer (entsprechend der verwendeten Polymerase), 0,2 mM dNTP, 0,5 mM $MgCl_2$, 2,5 U Taq-Polymerase und 0,2 µM von jedem Primer. Es wurden verschiedene Amplifikationsprotokolle angewendet.

2.2.2.3.3 Cyt P450 spezifisches Differential Display (DD-RT-PCR)

Die Differential Display Amplifizierung wurde mit einigen Abänderungen nach den Protokollen von Liang und Pardee (1992) bzw. Liang *et al.* (1993). Als Cyt P450 spezifische Decamer-Primer wurden die Primer nach Schopfer und Ebel (1998) verwendet.

Der grundsätzliche Ablauf beim Differential Display ist wie golgt. Es wird mRNA aus den zu vergleichenden Zellkulturen isoliert. Anschließend wird die mRNA zu cDNA revers transkribiert, wobei man sich den Poly-A-Schwanz zunutze macht. In der sich anschließenden PCR erfolgt durch die Decamer-Primer die selektive Amplifikation von Cyt P450, die Produkte werden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, differentielle Banden werden eluiert, erneut amplifiziert und kloniert. Das genaue Vorgehen wird im folgenden Teil beschrieben.

Die Gesamt-RNA wurde in getrennten Ansätzen aus induzierten und nicht induzierten Zellkulturen von *Ammi majus* isoliert und im Laufe der Reversen Transkription in separaten Ansätzen in je drei Untergruppen aufgeteilt. Dazu wurden die drei verschiedenen Pimer $T_{12}MA$, $T_{12}MC$ und $T_{12}MG$ eingesetzt, wobei M für eine Mischung aus den Nukleotiden A, C und G (A, C, G-Wobble) steht. Sie unterscheiden sich nur in ihrem letzten Nukleotid und erfassen alle Nukleotidfolgen der mRNA.

$T_{12}MA$:	5'-TTT TTT TTT (A/C/G) A-3'
$T_{12}MC$:	5'-TTT TTT TTT (A/C/G) C-3'
$T_{12}MG$:	5'-TTT TTT TTT (A/C/G) G-3'

Diese cDNA-Proben wurden in einer PCR in separaten Ansätzen mit je einem der Decamer-Primer D1- D8 nach Schopfer und Ebel (1998) und dem entsprechenden Primer der reversen Transkription ($T_{12}MA$, $T_{12}MC$ oder $T_{12}MG$) amplifiziert. Die Primer D1 - D8 basieren auf dem hochkonservierten PFG-Motiv.

5'- P F G x G R R x C x G - 3'

P	**F**	**G**
cca	ttc	gga
ccc	ttt	ggc
ccg		ggg
cct		ggt

D1:	5`-c g	c c a	t t t	g g
D2:	5`-c g	c c a	t t c	g g
D3:	5`-c g	c c c	t t t	g g
D4:	5`-c g	c c c	t t c	g g
D5:	5`-c g	c c g	t t t	g g
D6:	5`-c g	c c g	t t c	g g
D7:	5`-c g	c c t	t t t	g g
D8:	5`-c g	c c t	t t c	g g

Die Konzentrationen der PCR-Komponenten nach Optimierung waren wie folgt: Gesamtvolumen 20 µl mit 2 µl cDNA, 0,2 µM dNTP, 0,5 µM Decamer-Primer, 2,5 µM Ankerprimer, 10 µCi [α-^{35}S]-dATP, 1 x PCR-Puffer, 0,5 U Taq-Polymerase. Zur Amplifikation wurde das folgende Protokoll gewählt:

1x	94°C	10 Minuten	Denaturierung
40x	94°C	30 Sekunden	Denaturierung
	40°C	2 Minuten	Annealing
	72°C	30 Sekunden	Extension
1x	72°C	10 Minuten	Extension

In der PCR wird das [α-^{35}S]-dATP in die Sequenz eingebaut, wodurch später mittels Radiographie die Detektion der Banden erfolgen kann.

4 µl der PCR-Inkubation wurden mit 4 µl Ladepuffer versetzt, 3 Minuten bei 80°C denaturiert und auf ein 5 % iges Sequenzgel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung wurde das unfixierte Gel auf Whatman 3MM Papier gezogen und 1h bei 80 °C in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet. Die Exposition erfolgte über Nacht, die Detektion mittels Autoradiographie. Die differentiellen Banden wurden durch einen 1:1-Ausdruck des exponierten Gels lokalisiert und ausgeschnitten. Zur Elution der DNA aus dem Gel wurden verschiedene Methoden ausprobiert. Am besten geeignet war die Methode nach Lutterbüse (1995). Die ausgeschnittene Bande wird 10 Minuten in 50 µl Wasser hydratisiert und anschließend 15 Minuten bei 95°C inkubiert. Die DNA wird dann mit 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2), 0,2 mg/ml Glykogen und 2,5 Volumen Ethanol 100 % gefällt. Mit der eluierten DNA wurde eine zweite PCR in einem Ansatz von 50 µl zur Reamplifikation durchgeführt. Das Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und analysiert.

2.2.2.3.4 Cytochrom P450 spezifische PCR nach Fischer *et al.* (2001)

Die Klonierung verschiedener Cytochrom P450-Fragmente erfolgte modifiziert nach Fischer *et al.* (2001). Um die Unterschiede der induzierten und nicht-induzierten Zellen zu erfassen, wurde mit induzierten (+) und nicht induzierten (-) *Ammi majus* Zellen gearbeitet. Die reverse Transkription der zwei Gesamt-RNA-Fraktionen wurde mit dem Ankerprimer durchgeführt. Die Verwendung von Oligo A, C und G zur Unterteilung der cDNA in drei Fraktionen hatte sich nicht als vorteilhaft erwiesen. Anschließend wurden zwei PCR-Runden durchgeführt.

Dabei wurde mit der induzierten und der nicht induzierten cDNA gleich verfahren. Für die erste PCR-Amplifizierung wurden vier Primer von dem in Cyt P450 konservierten Motiv PERF abgeleitet. Mit diesen Primern als upstream-Primer und dem Ankerprimer als downstream Primer wurden die beiden cDNA-Fraktionen in Doppelansätzen unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 0,4 ng cDNA, 0,2 mM dNTP, 2,5 µM PERF, 0,25 µM Ankerprimer, 2,5 mM $MgCl_2$, 1u Taq-Polymerase (Promega). Folgendes PCR-Programm wurde gewählt:

1x	94°C	5 Minuten	Denaturierung
30x	94°C	2 Minuten	Denaturierung
	50°C	2 Minuten	Annealing
	72°C	2 Minuten	Extension
1x	72°C	5 Minuten	Extension

Jeder der 8 PCR-Inkubate (4 induzierte und 4 nicht induzierte) der ersten PCR-Runde wurden in einer zweiten, „nested“ PCR-Runde mit jedem der Decamer-Primern nach Schopfer und Ebel (1998) kombiniert. Als downstream Primer wurde der Ankerprimer (AP) eingesetzt. Insgesamt ergaben sich 64 Ansätze.

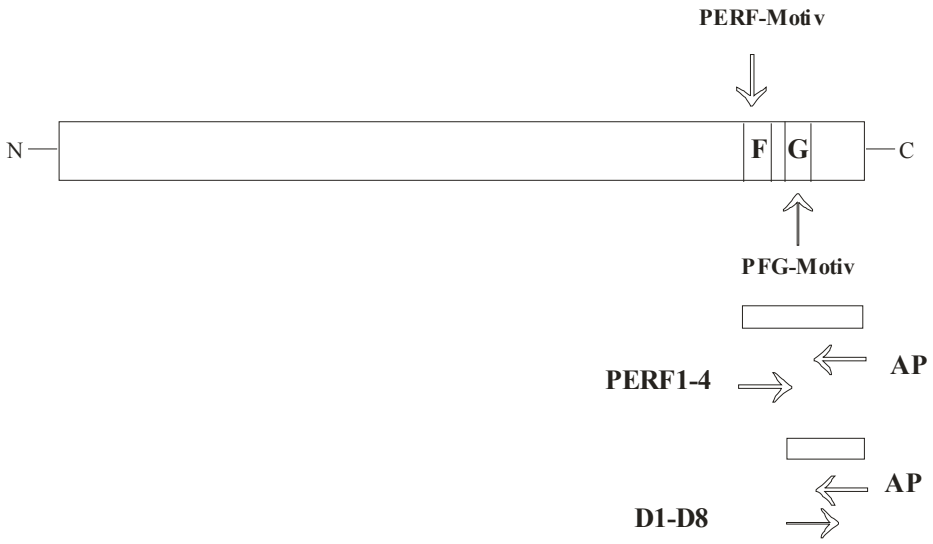


Abb. 23: Amplifizierte Fragmente in der 1. und 2. PCR nach Fischer *et al.*, 2001

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
PERF 1								
PERF 2								
PERF 3								
PERF 4								

Tab. 2: Primerkombinationen der 2. PCR nach Fischer *et al.*, 2001

Alle Ansätze wurden mit induzierter und nicht-induzierter mRNA parallel durchgeführt.

Vor der Amplifikation wurde das Template der ersten PCR-Runde 1:1000 verdünnt. Diese PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 6,3 µl PCR-Produkt 1:1000 verdünnt, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM Decamer-Primer, 2,5 µM Ankerprimer, 2 mM $MgCl_2$. Folgendes PCR-Programm wurde angewendet:

1x	95°C	5 Minuten	Denaturierung
30x	95°C	30 Sekunden	Denaturierung
	40°C	2 Minuten	Annealing
	72°C	30 Sekunden	Extension
1x	72°C	5 Minuten	Extension

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt und das Bandenmuster analysiert. Differentielle Banden wurden ausgestochen, mit einem Kit isoliert und mit den entsprechenden Primer erneut in einer dritten PCR-Runde amplifiziert. Anschließend wurden die Proben direkt über die überhängenden A-Nukleotide in den Vektor pCR2.1 (TOPO-TA-Cloning Kit, Invitrogen) einkloniert. Pro Transformation wurden 20 Kolonien gepickt, über Restriktionsverdau analysiert und sequenziert.

2.2.2.3.5 PCR zur Amplifizierung der cDNA der CPR

Zur Amplifizierung der CPR aus *Ammi majus* wurden zunächst die degenierten Primer CPR1 und CPR2 nach Koopmann und Hahlbrock (1997) angewendet. Dabei wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt: 60 pmol von jedem Primer, 3 µl cDNA, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 1 U Taq auf einem Volumen von 50 µl.

CPR1	5'-GA(GA)CCIACIGA(CT)AA(CT)GCIGC-3'
CPR2	5'-TC(AG)AA(ACT)TCIA(GA)(GA)TG(TGA)(GA)T(GA)CA-3'

Es wurde mit dem folgenden PCR-Programm inkubiert:

1x	3 Minuten	94°C
35x	1 Minute	94°C
	1 Minute	45 °C
	1 Minute	72°C
1x	7 Minuten	72°C

Da keine Amplifizierung erreicht wurde, wurden anschließend nicht degenerierte Primer von der CPR1 und CPR2 aus *Petroselinum crispum* abgeleitet.

CPR3.3	5'-CTGGCCATGCCTTTGGCATCACC-3'
CPR5.4	5'-CTTGCATATGAAACTGGTGACC-3'

Die PCR wurde mit dem folgenden Programm unter Standardbedingungen durchgeführt:

1x	3 Minuten	94°C
35x	1 Minute	94°C
	1 Minute	53-64°C
	2 Minuten	72°C
1x	7 Minuten	72°C

Das erhaltene Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) einkloniert, transformiert und analysiert.

2.2.2.4 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Die full-length cDNAs wurden mittels verschiedener RACE-Methoden erzeugt. Man unterscheidet je nach gesuchtem cDNA-Ende zwischen dem 3'- und dem 5'-RACE.

2.2.2.4.1 3'-RACE

Zur Erfassung des 3'-Endes der cDNA wurde eine Reverse Transkription von Gesamt-RNA mit dem Anker-Primer (AP) durchgeführt. Dieser Primer hybridisiert mit seiner dT_{17}-Sequenz an das Poly-A-Ende der RNA an. Am 5'-Ende ist der Primer mit einem 20-Basen-Adapter verlängert, an den in der folgenden PCR der upstream-Primer AUAP bindet. Als downstream-Primer wurden genspezifische Sequenzen gewählt, die von dem jeweiligen cDNA-Fragment aus der CYP-spezifischen PCR stammen. Bei allen Fragmenten war eine PCR mit den folgenden Zyklusparametern ausreichend:

1x	3 Minuten	94°C
35x	1 Minute	94°C
	1 Minute	53-64°C
	2 Minuten	72°C
1x	7 Minuten	72°C

Die optimale Annealing-Temperatur für den Primer wurde mit einem Gradienten ermittelt. Das sauberste PCR-Produkt wurde einkloniert, die DNA präparativ isoliert und anschließend sequenziert.

2.2.2.4.2 5'-RACE mit A- und C-Tailing

Das 5'-RACE mit A-Tailing wurde nach einem modifizierten Protokoll von Frohman *et al.* (1988) durchgeführt. Das C-Tailing erfolgte nach Protokollen der Firma Invitrogen. Nach einer Reversen Transkription von Gesamt-RNA mit einem genspezifischen Primer (GSP) und der Superscript II (Invitrogen, Niederlande; Protokoll siehe 2.2.2.2), wurden überschüssige Nukleotide und Primer-Moleküle mit dem PCR Clean up Kit (Boehringer, Mannheim) aus dem Ansatz entfernt. Anschließend erfolgte die Tailing-Reaktion mit dATP oder dCTP. In dieser Reaktion werden homopplymere Enden an die cDNA angefügt. Dazu wurden 5 µl 5 x Tailingpuffer, 6,5 µl Wasser, 2,5µl 2 mM dCTP bzw. dATP und 10 µl der gereinigten DNA bei 94°C für 2-3 Minuten denaturiert. Nach 1 Minute auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 µl

TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) und der Ansatz wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 Minuten bei 65°C inaktiviert.

In der ersten PCR wurden 8-10 µl der Tailing-Reaktion als Template mit dem jeweiligen Adapter Primer (AAP beim C-Tailing und oligo(dT)Anchor beim A-Tailing) und einem „nested“ genspezifischen Primer amplifiziert. In einer weiteren nested PCR wurde 1 µl des 1:10 verdünnten PCR-Produktes aus der ersten PCR mit dem AUAP und einem dritten GSP amplifiziert. Die PCR-Runden wurden mit 1-1,5 mM $MgCl_2$, 0,4 µM des jeweiligen RACE-Primers bzw. GSP, 0,2 µM dNTP und 2,5 U Taq DNA Poymerase (Promega) und den Zyklusparametern vom 3’-RACE durchgeführt. Produkte mit einer Länge von 1400-1500 bp wurden einkloniert, die DNA präparativ isoliert und sequenziert.

AAP	5’-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3’ (mit I = Inosin)
AUAP	5’-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3’
Oligo(dT)	5’-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT(AGC)(AGCT)-3’

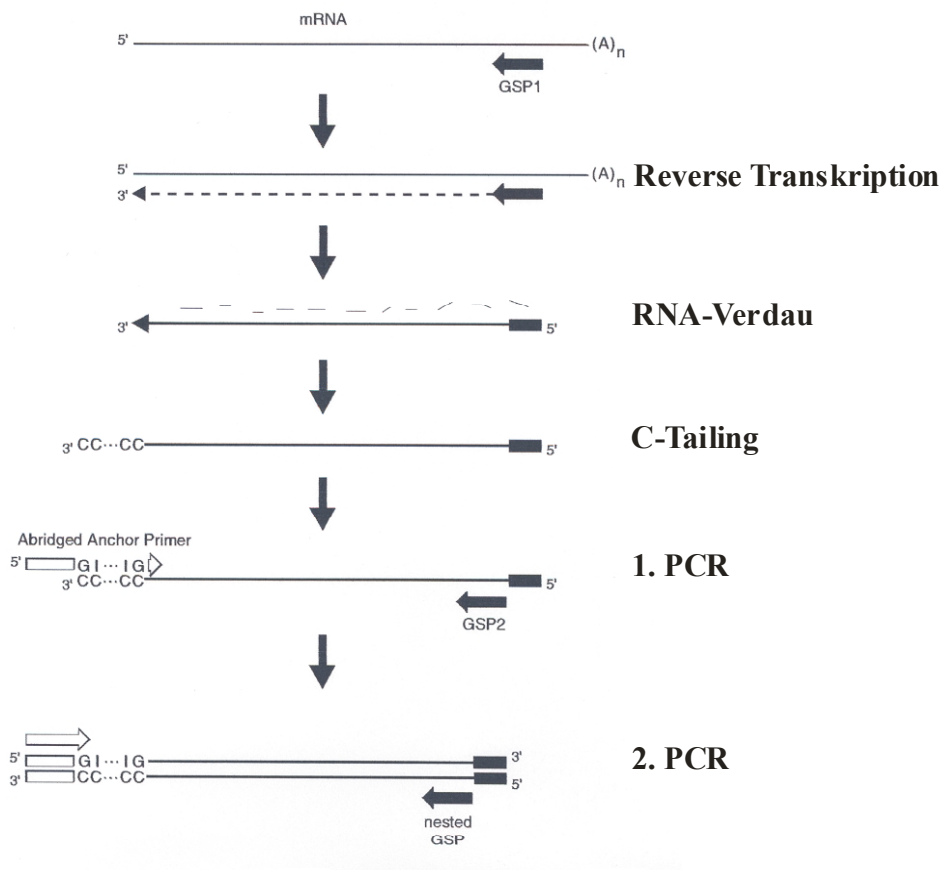


Abb. 24: Übersicht des 5’-RACE mit C-Tailing

2.2.2.4.3 RLM-RACE

Das RLM-RACE (RNA Ligase-Mediated Rapid Amplification of cDNA ends) wurde mit dem GeneRacer™ Kit der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) durchgeführt. Bei dieser Methode wird nicht wie beim herkömmlichen RACE die cDNA modifiziert, sondern bereits die mRNA. Als erstes wird die Gesamt-RNA mit einer aus der Darmschleimhaut von Kälbern gewonnenen alkalischen Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) behandelt.

Das Enzym spaltet 5'Phosphate von RNA ab, wobei intakte mRNA aufgrund ihrer 7-Methylguanosinkappe nicht verändert wird. Die CIP wird über eine Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. Im folgenden Schritt wird die 7-Methylguanosinkappe durch die saure Pyrophosphatase aus Tabak (tobacco acid pyrophosphatase, TAP) entfernt. Es erfolgt erneute eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Im Ergebnis liegt nur noch solche RNA 5'-phosphoryliert vor, die zunächst durch „capping" geschützt war, also der vollständigen mRNA entspricht. Über das 5'-Phosphat wird durch die T4-RNA-Ligase ein Adapter aus 44 bp über eine Hydroxylgruppe ligiert wird. Nach erneuter Phenol-Chloroform-Extraktion wird die reverse Transkription mit der Superscript II und dem GeneRACER OligodT. Es wurden zwei Runden von PCR-Amplifikationen durchgeführt. In der ersten PCR wurden 0.5 µl der cDNA mit dem jeweiligen GSP und dem Generacer 5'Primer amplifiziert. Die Konzentrationen der Komponeneten des PCR-Ansatzes folgten den Herstellerangaben. Die Zyklusparameter waren wie folgt:

1x	2 Minuten	94°C
5x	30 Sekunden	94°C
	2 Minuten	72°C
25x	30 Sekunden	94°C
	30 Sekunden	60-68°C
	2 Minuten	72°C
1x	7 Minuten	72°C

Als Template in der „nested PCR" wurde die mit dem Kit Nucleo Trap® (Macherey-Nagel) eluierte Bande oder das PCR-Produkt der ersten Runde verwendet. Dieser Ansatz wurde mit dem nested GSP und dem Generacer5'nested Primer amplifiziert. Folgende Zyklusparameter wurden verwendet:

1x	2 Minuten	94°C
25x	30 Sekunden	94°C
	30 Sekunden	60-68°C
	2 Minuten	72°C
1x	10 Minuten	72°C

Die entsprechenden Fragmente wurden in den Vektor pCR4-TOPO einkloniert, die DNA präpariert und sequenziert.

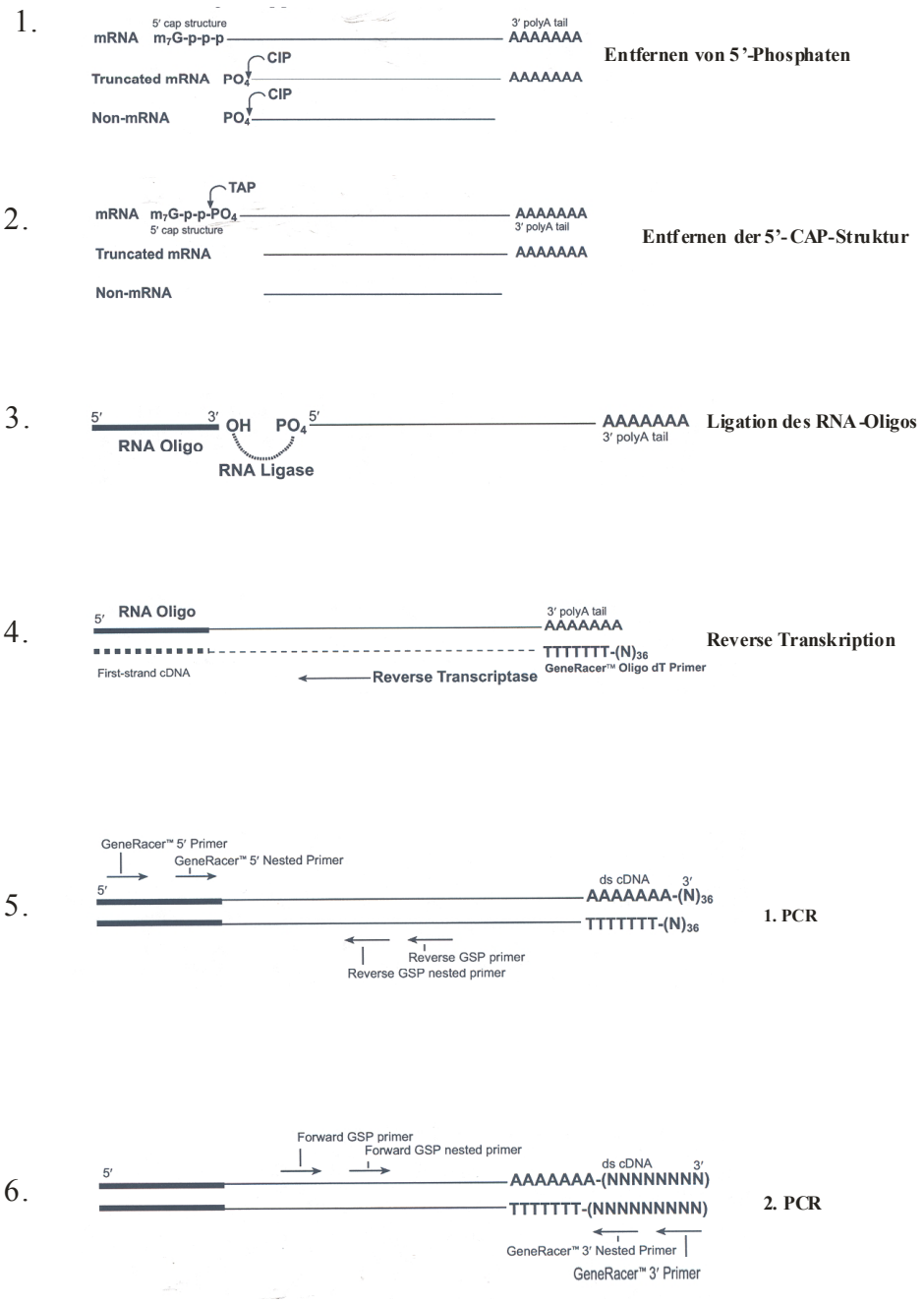


Abb. 25: Übersicht des RLM-RACE

5. 5'RACE und 6. 3'-RACE

2.2.2.4.4 Mutagenese-PCR

Die Mutagenesereaktionen zum Einfügen oder Entfernen von Restriktionsstellen innerhalb der cDNA wurde mit dem QuikChange® Multi Site Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Im Gegensatz zu älteren Mutageneseverfahren, die von der Einzelstrang-DNA ausgehen, wird als Template Doppelstrang-Plasmid-DNA verwendet. Das Prinzip der Mutagenese beruht auf PCR-Technik. Für eine solche PCR wurden 100 ng des kinasierten Primers, 50 ng des Templates, 1 x Polymerasepuffer, 1 µl des mitgelieferten dNTP

Mixes und 2,5 U der mitgelieferten PfuTurbo®DNA Polymerase eingesetzt. Folgendes Programm wurde verwendet:

1x	1 Minute	95°C
30x	1 Minute	95°C
	1 Minute	55°C
	8 Minuten	65°C

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

2.2.2.5 Präparation von DNA

2.2.2.5.1 Präparation von Plasmid DNA

2.2.2.5.1.1 Methode A

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab werden 1,4 ml einer Übernachtkultur bei 10 000 rpm 5 Minuten abzentrifugiert. Der Niederschlag wird in 100 µl Lösung I (5 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) resuspendiert, und es werden 200 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1% SDS) zugegeben. Nach 10 Minuten auf Eis gibt man 150 µl Lösung III (5 M Kaliumacetat, pH 4,8) hinzu und fällt die Proteine 20 Minuten auf Eis. Nach Extraktion des Ansatzes mit 450 µl Phenol: Chloroform 1:1, wird 10 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und die DNA mit 750 µl absolutem Ethanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand verworfen, das Pellett mit 600 µl Ethanol 70% gewaschen und getrocknet. Man löst in 15 µl TE-Puffer pH 8 und analysiert den Restriktionsverdau auf einem Agarosegel.

Zur Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab werden 25 ml einer Übernachtkultur abzentrifugiert, in 1,5 ml Lösung I suspendiert und mit 166 µl Lysozym (10 mg/ 100 µl) versehen. Nach 15 Minuten werden 3,3 ml Lösung II zugegeben und der Ansatz wird erneut 10 Minuten auf Eis belassen. Die Proteine werden mit 2,5 ml Lösung III 20 Minuten auf Eis gefällt und anschließend bei 4°C und 10 000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird mit Phenol: Chloroform 1:1 extrahiert und erneut bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wird die Oberphase mit 15 ml absolutem Ethanol versehen und 15 Minuten stehen gelassen. Anschließend wird 15 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 1,4 ml TE-Puffer pH 8 gelöst und auf 2 Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Die RNA wird 1 Stunde mit 10 µl RNase verdaut. Man extrahiert mit 700 µl Phenol: Chloroform 1:1, zentrifugiert und fällt die DNA aus dem Überstand mit 1/10 V 3 M Natriumacetat pH 6,0 und dem gleichen Volumen absolutem Ethanol bei -70°C mindestens 1 Stunde. Nach Zentrifugation bei 4°C wird das Pellet mit Ethanol 70 % gewaschen und getrocknet. Auch hier erfolgt die Analyse über einen Restriktionsverdau mit anschließendem Agarosegel. Zusätzlich wird die Konzentration an einem UV-Meter bei 260 und 280 nm bestimmt. Folgende Konstanten wurden verwendet:

$A_{260} = 1{,}0$ = 50µg dsDNA/ml

2.2.2.5.1.2 Methode B

2 ml einer Übernachtkultur werden abzentrifugiert und in 150 µl GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,02 mg/ml RNase) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lyselösung (0,2 N NAOH, 1 % (w/v) SDS) wird gemischt und 5 Minuten auf Eis belassen. Anschließend werden 150 µl Lösung III (5 M Kaliumacetat, pH 4,8) zugegeben und die Proteine für 10 Minuten auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm für 10 Minuten wird der Überstand mit 1 ml Ethanol 100 % versetzt und die DNA wird für 2 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Das durch Zentrifugation (2 Minuten, 13 000 rpm) erhaltene DNA-Pellett wird mit 1 ml Ethanol 70 % gewaschen, getrocknet und in 25-50 µl TE-Puffer pH 8,0 resuspendiert.

Außerdem wurde Plasmid-DNA mit verschiedenen Kits nach den jeweiligen Herstellervorschriften isoliert.

2.2.2.5.2 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung erfolgt nach Dellaporta *et al.* (1983). Es werden 15 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM 2-Mercaptoethanol) auf Eis vorgelegt und mit 1-3 g zermörsertem Pflanzenmaterial versetzt. Nach Mischen und Zugabe von 1 ml 20% SDS pH 7,2 inkubiert man unter gelegentlichem Rühren 10 Minuten bei 65°C. Es werden 5 ml 5 M Kaliumacetat zugegeben und erneut 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird 20 Minuten bei 25000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Röhrchen überführt, es werden 10 ml Isopropanol zugegeben und die DNA wird 40 Minuten bei -20°C gefällt. Man zentrifugiert bei 20000 x g und 4°C, verwirft den Überstrand, trocknet das Pellet und löst es in 700 µl 50 TE (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA). Nach Zugabe von 7 µl RNase A (2000 U/ml) wird 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgt die Zugabe von 75 µl 3 M Natriumacetat und es wird erneut zentrifugiert. Der Überstand wird mit 500 µl Isopropanol versehen, gemischt und 5 Minuten auf Eis belassen. Nach 15-minütiger Zentrifugation wird das Pellet in 500 µl Ethanol 70% gewaschen, getrocknet und in 200 µl 10 TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

2.2.2.6 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalysen wurden von Dr. Zauner (Philipps-Universität Marburg, Zellbiologie) und MWG Biotech durchgeführt.

Vergleiche mit Gen-Datenbanken wurden über das Programm WU-Blast2 (http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/) und mit Megablast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) durch-geführt. Sequenzvergleiche auf DNA- und Proteinebene wurden mit ClustalW (http://www.ebi.ac.uk.clustalw/) durchgeführt.

2.2.2.7 Northern Hybridisierung (Dot Blot)

2.2.2.7.1 Radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten

Die als Sonde dienende DNA-Probe wurde mit dem Kit Rediprime™ II-random prime labeling System von Amersham Pharmacia Biotech und [α-^{32}P] dCTP (ICN, Meckenheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die markierte DNA wurde über eine Sephadex G-50 Säule von den nicht eingebauten Nukleotiden getrennt.

2.2.2.7.2 Blotting

Das Blotting wurde mit der Minifold I-SRC 96-Dot Blot-Apparatur (Schleicher & Schüll, Dassel) durchgeführt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit einem UV-Spektrometer und einem Agarosegel zur Ladekontrolle. Dazu wurden 4 µg Gesamt-RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels des Bioimagers erneut gemessen. Die zweite Quantifizierung zeigt sich als erforderlich, da die Messungenauigkeiten bei einer alleinigen Auswertung mit dem UV-Spektrometer zu gross waren. 4 µg Gesamt- RNA pro Ansatz werden jeweils in einem Volumen von 30 µl Lösung (2,2 M Formaldehyd, 50 % Formamid, 0,5 x MOPS-Puffer pH 7) für 15 Minuten bei 68°C denaturiert. Nach 5 Minuten auf Eis werden 30 µl eisgekühltes 20 x SSC zugegeben. Die Proben sind nun bereit zum Auftragen auf die Membran.

Die Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Biosciences) wird in Aqua bidest. hydriert und anschließend in 10 x SSC geschüttelt. Das verwendete Whatman-Papier wird in 10 x SSC geschwenkt. Der weitere Aufbau der Apparatur erfolgt nach Herstellerangaben. Die Proben werden mittels Vakuum auf die Membran transferiert. Man spült mit 30 µl 10 x SSC nach. Die RNA auf der Membran wird durch Backen 2 Stunden bei 80°C fixiert.

2.2.2.7.3 Hybridisierung

Nach 3 Stunden Prähybridisierung bei 68°C in 5 x SSC, 2 x Denhardt's, 0,1 % SDS und 100 µg/ml Heringsperma-DNA wurde die Sonde nach Denaturierung zugegeben und 16 Stunden bei 68°C hybridisiert. Anschließend wurde für 20 Minuten mit 2 x SSC/ 0,1 % SDS bei Raumtemperatur, 20 Minuten bei 68°C und falls notwendig 20 Minuten bei 68°C mit 1 x SSC/ 0,1 % SDS gewaschen. Die Quantitative Auswertung erfolgte mit dem Bioimager wie unten beschrieben.

Die relative Transkriptmenge wurde nach der Hybridisierung mit radioaktiver Sonde im Bioimager FLA 2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) bestimmt.

2.2.2.8 Expression in Hefe

2.2.2.8.1 Klonierung in den Hefeexpressionsvektor pYeDP60

Zur Klonierung in pYeDP60 ist eine BamHI Restriktionsschnittstelle direkt vor dem ATG erforderlich. Diese wurde in einer PCR mit proofreading DNA Polymerase eingefügt, und die interne BamHI-Schnittstelle wurde durch „site-directed mutagenesis" entfernt. Die erforderliche EcoRI-Schnittestelle am 3'-Ende wurde durch Herausschneiden des Inserts aus dem Vektor pCR2.1 (Invitrogen) erhalten. Nach Restriktionsverdau mit BamHI und EcoRI wurde nach elektrophoretischer Auftrennung die DNA isoliert. Das so erhaltene Fragment hatte eine BamHI-Schnittestelle am 5'-Ende und eine EcoRI-Schnittestelle am 3'-Ende und konnte so in den geöffneten Vektor ligiert werden. Das Ligationsprodukt wurde in XL1-Blue transformiert und die DNA isoliert.

2.2.2.8.2 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Untransformierte Hefen wurden in YPGA-Medium vermehrt. Transformierte Hefen wurden in SGI-Medium kultiviert.

2.2.2.8.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Der Hefevektor mit dem entsprechenden Insert wurde mit dem S.c. Easy comp Kit von Invitrogen (Niederlande) in die Hefen eingebracht.

2.2.2.8.4 Induktion von transformierten *Saccharomyces cerevisiae*

Die Induktion der transformierten Hefezellen erfolgte nach Pompon *et al.* (1996). Es wurden 5 Kolonien gepickt und in je 5 ml SGI-Medium über 16 Stunden bei 250 rpm und 28°C angezogen. Anschließend wurden die Vorkulturen in 250 ml YPGE überimpft (OD_{600}=0,2). Bei einer Dichte von OD_{600} 0,8-1,2 wurde mit 27 ml 20 %iger Galaktose-Lösung induziert. Nach einer Inkubation von 14 bis 16 Stunden wurden die Hefen geerntet und die Mikrosomen isoliert.

2.2.2.8.5 Isolierung der Hefemikrosomen

Die Isolierung der Mikrosomen erfolgte 14-16 Stunden nach der Galaktoseinduktion mit einem modifizierten Protokoll nach Pompon *et al.* (1996). Dabei wurden die Hefemikrosomen von Hefezellen einer 270 ml Kultur mittels Zentrifugation (5 Minuten, 5000 x g) geerntet. Das Pellet wurde in 27 ml TEK-Puffer resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in 2,5 ml eiskaltem TES-B Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 7,5 g säuregewaschenen Glasperlen (∅ 425-600 µm, Sigma) durch kräftiges Schütteln aufgeschlossen. Dabei wurde das Gefäß jeweils 30 Sekunden geschüttelt und dann für 30 Sekunden auf Eis gekühlt. Dieser Vorgang wurde 20 Mal wiederholt. Der Ansatz wurde dreimal mit 5 ml TES-B gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei 16000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in einen 25 ml Messzylinder gegeben, in dem 940 µl 4 M NaCl vorgelegt waren, und mit TES-B auf 25 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt, und nach Mischen wurden 2,5 g PEG 4000 (Roth) zugegeben. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (10500 rpm, 10 Minuten). Das Pellet wurde zweimal mit TES-B gewaschen und in 1,5 ml TEG im Potter homogenisiert. Aliquots á 150 µl wurden im flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70°C gelagert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Test auf C4H-Aktivität

Zu Beginn wurde die Enzymaktivität der C4H in einem gekoppelten Enzymtest gemessen. Es wurden 1,1 x 10^6 dpm L-[U-^{14}C]Phenylalanin, 1 µM *Rhodutorula glutinis* PAL, 1,2 mM NADPH und 17,25 µg mikrosomales Protein bei 37°C in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 1 Stunde inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 114 µl. Gestoppt wurde mit 20 µl Trichloressigsäure 24%. Anschließend wurde mit 200 µl Ethylacetat extrahiert, 150 µl davon wurden im Vakuum eingeengt, in 20 µl Ethylacetat aufgenommen und auf einer Kieselgel-dünnschichtplatte in Laufmittel A oder B analysiert.

Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie mit dem Bioimager FLA-2000. Der direkte Enzymtest wurde analog ohne die *Rhodutorula glutinis* PAL und ^{14}C-Phenylalanin, aber mit [U-^{14}C]Zimtsäure durchgeführt.

2.2.3.2 Test auf Marmesinsynthase-Aktivität

Der Enzymtest wurde nach Hamerski *et al.* (1988a) in 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) mit 10 µl [3-^{14}C]Demethylsuberosin (6000 cpm/µl) 1 mM EDTA und 20 mM NADPH bei 20°C und 25 °C durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bis 2 Stunden.

Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung auf Kieselgel wurde das Laufmittel C eingesetzt.

2.2.3.3 Test auf C3H-Aktivität

2.2.3.3.1 4-Cumarsäure

Es wurde im Enzymtest der C4H radioaktive 4-Cumarsäure produziert, die nach dünschichtchromatographischer Auftrennung mit Ethylacetat extrahiert wurde. Diese wurde dann mit 1,2 mM NADPH, 17,25 µg mikrosomalen Protein in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 bei 30 °C für 2 Stunden inkubiert. Gestoppt wurde mit 20 µl Trichloressigsäure (24 %) und extrahiert mit 2 x 100 µl Ethylacetat. Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung auf Kieselgel wurde das Laufmittel A eingesetzt.

2.2.3.3.2 Umsatz von Cumarsäuremethylester

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 210 µl. 1,2 mM NADPH, verschiedene Konzentrationen von Cumarsäuremethylester (bis 150 µM) und 17,25 µg mikrosomales Protein wurden in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 für 90 Minuten bei 28°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20 µl Trichloressigsäure (24 %) gestoppt. Nach zweimaliger Extraktion mit Ethylacetat, erfolgte eine HPLC-Auftrennung. Dazu wurde eine Hypersil ODS 5 µm –Säule von Crom und ein Fließmittel aus 45 % Methanol und 0,01 % Phosphorsäure verwendet. Die Probe wurde in 100 µl Methanol 50 % gelöst und ein Volumen von 20 µl eingespritzt. Der Fluss betrug 0,8 ml/min, der Druck 240 bar.

2.2.3.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Mikrosomen erfolgte nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

2.2.3.5 Nachweis der Aktivität der CPR in Hefemikrosomen

Die Aktivität der CPR in Hefemikrosomen wurde nach Urban *et al.* (1990, 1994a) ermittelt. Die Reduktion von Cytochrom c erfolgt bei RT nach der Zugabe von 10-40 µg mikrosomalen Protein. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

1 mM Cytochrom c	25 µl
37 mM NADPH	1,5 µl
100 mM KCN	5 µl
200 mM Tris-HCL pH 7,0	250 µl
Aqua dest.	220 µl
Mikrosomales Protein	10-40 µg

Die Messung erfolgte 5 Minuten. Anhand des Mittelwertes von drei Messungen der Absorption bei 550 nm wurde die spezifische Enzymaktivität wie folgt bestimmt:

$$\text{Spezifische } E_{akt} = \Delta A_{550} \times \varepsilon^{550} \times V \times t^{-1} \times p^{-1}$$

ΔA_{550}: Absorptionsänderung bei 550 nm
ε^{550}: Differentieller Absorptionskoeffizient von Cytochrom c (21 $mM^{-1}cm^{-1}$)
V: Reaktionsvolumen
t: Reaktionszeit
p: Menge an mikrosomalen Protein

2.2.4 Sonstiges

2.2.4.1 Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Bio Imager FLA-2000 von Fuji Photo Film (Tokyo, Japan) und der Software von Raytest (Straubenhardt) ausgewertet. Die Markierung der Sonde wurde mit dem Szintillationszähler bestimmt.

3. Ergebnisse

Ammi majus bildet eine Vielzahl von Sekundärstoffen, von denen viele aus dem Phenylpropanweg stammen. Im generellen Phenylpropanweg entsteht aus L-Phenylalanin das Cinnamoyl- oder Cumaroyl-CoA, aus denen wiederum über spezifische Wege die verschiedenen Stoffklassen wie die Flavonoide, Lignane und Cumarine gebildet werden. Aus dem Cumarin Umbelliferon gehen lineare Furanocumarine (Psoralene) hervor, die vielen Pflanzen besonders der Familie der Apiaceae und Rutaceae als Abwehrstoffe dienen. Die Funktion der Psoralene als Abwehrstoffe begründet die Induzierbarkeit der Furanocumarinbiosynthese durch pilzliche Elicitoren. Dadurch können verschiedene Methoden, die auf Unterschieden der Transkriptionsebene beruhen, wie zum Beispiel das Differential Display eingesetzt werden.

An der Biosynthese der linearen Furanocumarine sind mehrer Cyt P450 beteiligt. Die *trans*-Zimtsäure wird im generellen Phenylpropaneweg durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H), einem Cyt P450, zur 4-Cumarsäure hydroxyliert. Das Umbelliferon entsteht vermutlich durch eine anschließende *ortho*-Hydroxylierung, wo die Katalyse durch ein Cyt P450 diskutiert wird. Aus Vorstufenexperimenten ist bekannt, dass bei der weiteren Umsetzung von Umbelliferon zum Bergaptol drei Cyt P450 beteiligt sind, nämlich die Marmesinsynthase, Psoralensynthase und Psoralen-5-monooxygenase. Da bis auf die C4H noch keines der Cyt P450 kloniert werden konnte, war das Ziel der Arbeit, so viele Elicitor-induzierbaren Cyt P450 aus *Ammi majus* zu klonieren und, falls möglich, die Funktion nachzuweisen.

3.1 Induktion der Furanocumarinbiosynthese

Die Induzierbarkeit der Furanocumarinbiosynthese durch Hefeextrakt oder *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (*Pmg*) als Elicitoren wurde bereits in den 80-iger Jahren an Zellkulturen von *Ammi majus* und *Petroselinum crispum* untersucht (Wendorff und Matern, 1986; Hamerski und Matern, 1988a, b). Hierbei hatte sich gezeigt, dass Zellkulturen von Apiaceae im Dunkeln zwar keine Psoralen bilden, aber durch pilzliche Elicitoren gut induzierbar sind (Tietjen *et al*., 1983a; Tietjen und Matern, 1983b). Inzwischen ist die Induktion unter anderen auch in *Glehnia littoralis* nachgewiesen worden (Kitamura *et al*., 1998).

Die Induktionszeit wurde aus den Vorarbeiten, die mit Mikrosomen aus induzierten Zellkulturen durchgeführt worden sind, abgeleitet. Die Marmesinsynthase hat nach 12

Stunden *Pmg*-Induktion ihre höchste Aktivität erreicht und fällt dann langsam wieder ab (Hamerski und Matern, 1988a). Da die proteinkodierende mRNA zu einem früheren Zeitpunkt gebildet wird, wurde eine Induktion von 3-5 Stunden gewählt. Zur Kontrolle auf Furanocumarinbildung der Zellkulturen wurden Teile der jeweiligen Kulturen für 20 Stunden induziert und dann die Fluoreszenz der Furanocumarine unter UV betrachtet bzw. dünnschichtchromatographisch analysiert.

3.2 Isolierung von CYP-spezifischen cDNA-Fragmenten

Zunächst wurde als Ansatz zur Isolierung von CYP-spezifischen cDNA-Fragmenten eine Standard-RT-PCR mit den Primern CypA und CypB nach Akashi *et al.* (1997) durchgeführt.

CypA 5'-(AG) (AC) I T (AT) (CT) III CCI (AG) (AT) (AG) AG (AG) TT-3'

CypB 5`-(ACT) TI (GC) CI TT (CT) (AG) GI III GGI (AC) (GC) I (AC) G-3`

Diese Primer leiten sich von zwei in Cyt P450 hoch konservierten Regionen ab, wobei das I für Inosin steht und an jedes Nukleotid der Matrize binden kann. CypA ist von der konservierten Region [EEFxPERF] abgeleitet, CypB von der Region [PFGxGRRxCxG]. Die verwendete RNA ist aus 3-5 h mit *Pmg* induzierten Zellkulturen gewonnen worden. Dieser Ansatz lieferte auch nach diversen Variationen der PCR-Bedingungen keine distinkten Banden auf dem Agarosegel.

Da über Standard-PCR keine Amplifizierung von Cyt P450 erreicht wurde, wurde als nächster Ansatz das Differential Display (Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, DD-RT-PCR) gewählt. Es ist eine auf PCR basierende Methode und sie ermöglicht den Vergleich von RNA-Populationen, die verschiedene physiologische Zustände repräsentieren (Bauer *et al.*, 1993; Liang und Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993). Sie kann dabei zur Isolierung von differentiell exprimierten Genen führen, daher sollten in dieser Arbeit RNA-Populationen aus unbehandelten und induzierten Zellkulturen von *Ammi majus* eingesetzt werden. Schopfer und Ebel (1998) haben die Methode so modifiziert, dass mittels Cyt P450 spezifischen Primern besonders Cyt P450 Enzyme amplifiziert werden und damit die Spezifität erhöht wird.

Um alle mit *Pmg* transkriptionell aktivierten Cyt P450 aus *Ammi majus* zu erfassen wurden die induzierten und nicht induzierten RNA-Populationen getrennt jeweils mit den drei Anker-oligo-dT-Primer Oligo A, C, G (siehe 2.2.2.3.3) und jedem der 8 Decamer-Primer amplifiziert. Durch die Wahl der drei Ankerprimer wird schon bei der reversen Transkription

die mRNA in drei Populationen aufgeteilt, wodurch die Komplexität der cDNA verringert wird und somit das Bandenmuster nach der PCR überschaubarer ist. Als forward Primer dienen die acht Decamer-Primer (siehe 2.2.2.3.3), die sich von dem in Cyt P450 hochkonserviertem PFG-Motiv [PFGxGRRxCxG] ableiten. Die Decamer-Primer decken alle möglichen Nukleotidfolgen für die Aminsosäurefolge PFG ab. Bei dieser Primer-Kombination werden P450-Fragmente mit einer Länge von 250-500 bp erwartet.

Zunächst wurden die PCR-Bedingungen soweit optimiert, dass ein deutliches Bandenmuster zu sehen war. Leider war die Elution der differentiellen Banden aus dem Gel trotz Anwendung verschiedener Methoden nicht erfolgreich.

Abb. 26: Cyt P450 spezifische DD-RT-PCR mit dem Decamer 7 und Oligo C

+ bedeutet induziert mit *Pmg*, - bedeutet nicht induziert. Die differentiellen Banden sind mit Kästen markiert.

Bei der DD-RT-PCR mit *Ammi majus* mRNA wurde ein überraschendes Ergebnis beobachtet. Bei der Primerkombination Oligo A und D7 waren im nicht induzierten Ansatz mehr Banden zu sehen, als im induzierten. Da mit Doppelansätzen gearbeitet wurde, kann eine zufällige Amplifikation von falsch positiven Fragmenten ausgeschlossen werden. Im nicht induzierten Ansatz müsste dann nach der Behandlung mit pilzlichem Elicitor eine Repression von Genen stattfinden. Da im Zusammenhang mit der Furanocumarinbiosynthese eine Induktion erwartet wird, wurden diese Banden nicht weiter verfolgt.

Da das Differential Display nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde parallel die zu dem Zeitpunkt ganz neue PCR-Methode nach Fischer *et al*. (2001) angewendet. Im Unterschied zum Differential Display zielt sie nicht auf die Isolierung eines einzelnen differentiell exprimierten Gens, sondern auf die Isolierung möglichst vieler Cyt P450 einer Pflanze. Um zusätzlich den differentiellen Effekt der Furanocumarinbiosynthese auszunutzen, wurde die Methode wie im Methodenteil beschrieben leicht modifiziert.

Die reverse Transkription und die sich anschließende PCR wurden mit verschiedenen Primern ausprobiert. Da die besten Ergebnisse mit dem Ankerprimer AP (siehe Anhang) und nicht mit den Primern Oligo A, C, G erreicht wurden, wurde auf die Unterteilung in drei RNA-Populationen verzichtet. In der ersten PCR-Runde wurden als forward Primer die vier PERF-Primer (PERF1-4, siehe Anhang) verwendet. Sie leiten sich von dem konservierten Bereich [EEFxPER] ab. Die Auswahl dieses Motivs ermöglicht es in einer zweiten „nested“ PCR die acht Decamer-Primer nach Schopfer und Ebel anzuwenden. Dazu wurden die PCR-Produkte der ersten Runde 1:1000 verdünnt und jeder Ansatz mit jedem der 8 Decamer Primer und dem AP als reversen Primer amplifiziert.

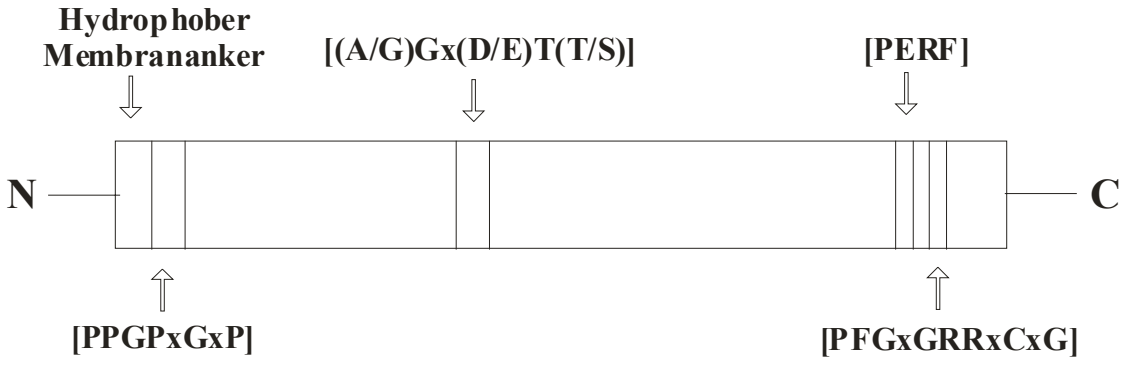


Abb. 27: Lage des [PERF]-Motivs und des [PFG]-Motivs

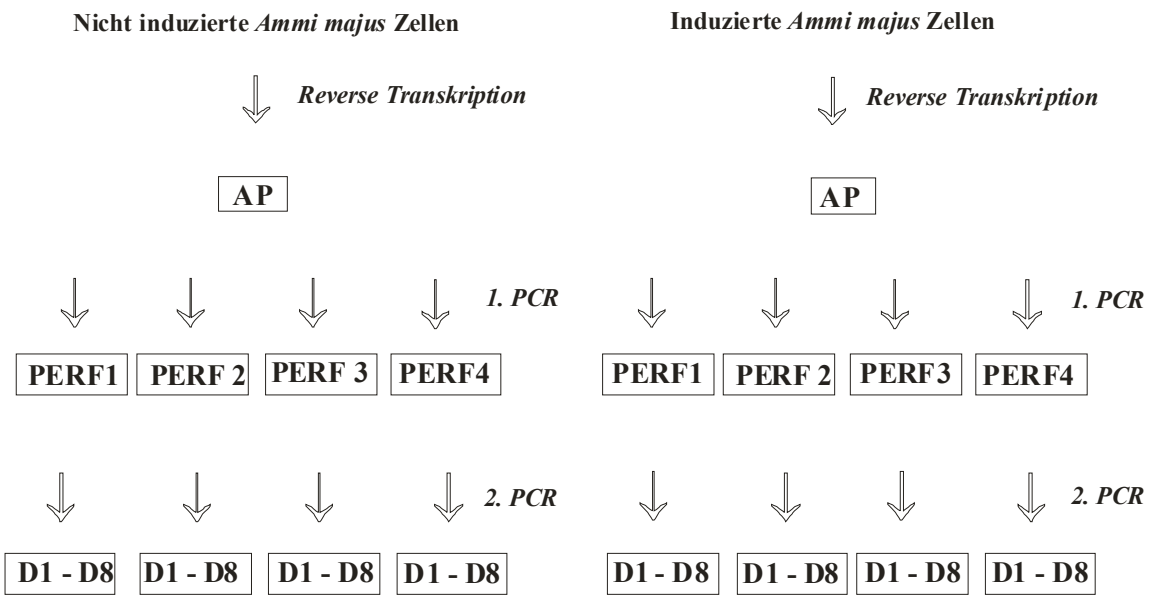


Abb. 28: Schema der PCR-Methode nach Fischer *et al.* (2001)

Auf Agarosegelen waren distinkte Banden zwischen 250 und 500 bp zu detektieren. Differentielle Banden aus der zweiten PCR-Runde wurden aus dem Gel (NuSieve Agarose, Biozym) eluiert und wenn notwendig in einer weiteren PCR analog zur zweiten PCR erneut amplifiziert. Die Amplifizierungen lieferten zunächst sechs verschieden cDNA-Fragmente mit großer Homologie zu P450-Enzymen. Nach Generierung der vollständigen cDNAs stellten sich zwei dieser Sequenzen als identisch heraus, so dass fünf verschiedene Klone (*Am*CYP73A41, *Am*CYP71AJ1, *Am*CYP98A21, *Am*CYP76B8, *Am*CYP82H1) erhalten wurden. Obwohl die PCR mit unterschiedlich lang induzierter cDNA (3-8 h) durchgeführt worden ist und in *Ammi majus* viele weitere Cyt P450 exprimiert werden, wurden nach Sequenzierungen immer wieder die ESTs der fünf Klone erhalten.

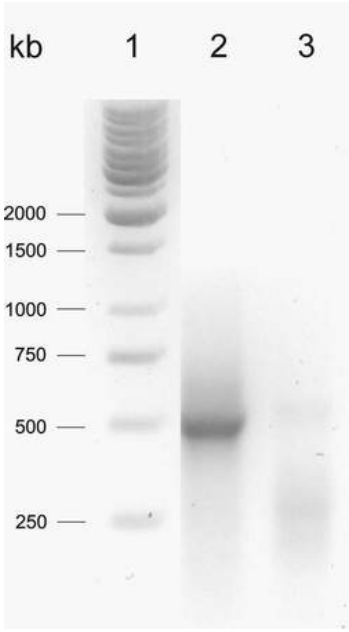


Abb. 29: Auftrennung im Agarosegel von amplifizierten P450-Fragmenten

Bahn 1 DNA-Standard zur Kalibrierung
Bahn 2 mit RNA-Template aus 5h induzierten *Ammi majus* Zellen
Bahn 3 mit RNA-Template aus nicht-induzierten *Ammi majus* Zellen

Die Bindung der PERF-Primer hat sich als nicht sehr spezifisch erwiesen, was am Beispiel von *Am*CYP73A41 erläutert werden soll. Das erste Fragment wurde mit den Primerkombinationen PERF1/ Decamer5 und PERF2/ Decamer5 erfasst. Die Primer PERF 1-4 unterscheiden sich lediglich in ihren letzten drei Nukleotiden, PERF1 und 2 sogar nur in der vorletzten Base, was in diesem Fall nicht zu einer selektiven Amplifizierung der jeweils passenden Sequenzen führte.

PERF1	GC	GGA	TCC	GA(AG)	GA(AG)	TT(CT)	(AC)G(AGCT)	CC(AGCT)	GAG	AG
PERF2	GC	GGA	TCC	GA(AG)	GA(AG)	TT(CT)	(AC)G(AGCT)	CC(AGCT)	GAG	CG
EST 1	AAT	AAA	CCA	GAT	GAG	TTT	AGG	CCT	GAG	GA
Sequenz 1	N	K	P	D	E	F	R	P	E	R

Decamer2	CG	CCA	TTC	GG
Decamer5	CG	CCG	TTT	GG
EST	TA	CCA	TTC	GG
AS		P	F	G

Tab. 3: Vergleich der eingesetzten Primer und der isolierten ESTs

Die „nested“ PCR mit den Decamer-Primern hat sich als notwendig erwiesen, da eine Klonierung der Produkte aus der 1. PCR zu keinen auswertbaren Sequenzen führte.

Im Vergleich zum Differential Display ist die Trennung auf Agarose undifferenzierter, da hier pro Bande mehrere verschiedene Sequenzen enthalten sind.

3.3 Generierung der fünf vollständigen cDNA-Klone

Die fünf cDNA-Fragmente aus der PCR nach Fischer *et al*. (2001) wurden mittels verschiedener RACE-Techniken vervollständigt.

Da die 3’-Enden der ersten Fragmente viele Sequenzierungenauigkeiten enthielten, wurden diese bei allen Klonen mit dem 3’-RACE erneut generiert. Nach reverser Transkription mit dem Primer AP (siehe Anhang) als 3’-Primer wurde in der PCR neben dem Primer AUAP bzw. AP (siehe Anhang) der jeweilige genspezifische Primer (GSP) als 5’-Primer eingesetzt. Die Annealingtemperatur lag je nach Primer zwischen 53 und 64°C.

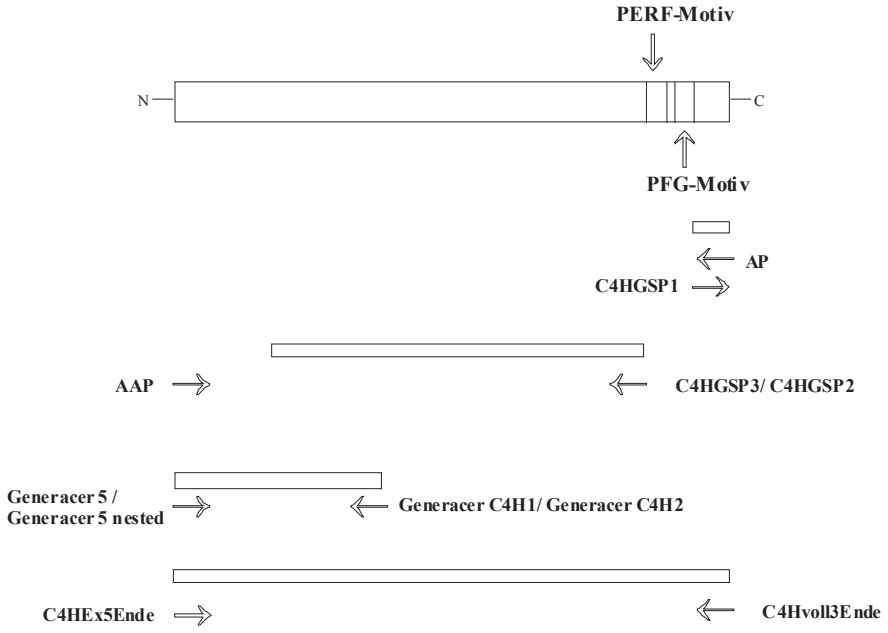
Zur Vervollständigung in 5’-Richtung wurde zunächst das 5’-RACE mit C- und A-Tailing probiert. In der 1. PCR-Amplifizierung wird jeweils ein genspezifische Primer als antisense Primer und der Abridged Adapter Primer (AAP, siehe Anhang) als sense Primer eingesetzt. Anschließend wird in einer 2. „nested“ PCR das PCR-Produkt aus der 1. PCR mit dem AAP und einen weiter in 5’-Richting liegenden genspezifischen Primer amplifiziert. Es waren zwar nach elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegelen Banden der richtigen Länge (ca. 1500 bp) sichtbar, die Mengen reichten jedoch nicht zum Klonieren. Auch ein Ausschneiden aus dem Gel und erneute Amplifikation führte nicht zum Ziel. Die Fragmente, die sich einklonieren ließen waren unvollständig, da das Startcodon fehlte. Ein Problem ist vermutlich die Prolinreiche Region nahe am 5’-Ende, denn die Codons für Prolin (CCX) können beim C-Tailing eine falsche Bindung der Primer verursachen, so dass die Isolierung des gesamten 5’-Bereiches schwierig ist.

Da durch ein RACE mit C- und A-Tailing kein komplettes 5’-Ende isoliert werden konnte, wurde das RLM-RACE-Verfahren angewendet, womit bei allen fünf cDNA-Fragmenten auf Anhieb das komplette 5’-Ende isoliert werden konnte.

3.3.1 *Am*CYP73A41

*Am*CYP73A41 war die einzige Sequenz, bei der bei der Amplifizierung in 5’-Richtung mit dem Tailing ein unvollständiges Fragment kloniert werden konnte. Bei allen anderen Sequenzen reichte die DNA nicht zum klonieren. Dies zeigt, dass mit dieser Methode im Gegensatz zum RLM-RACE im Laufe der reversen Transkription auch unvollständige mRNA

umgeschrieben wird. In der folgenden Tabelle sind die zur Amplifizierung verwendeten Primer und die dabei erhaltenen Fragmente angegeben. Das unterste Fragment entspricht dem ORF von CYP73A41.



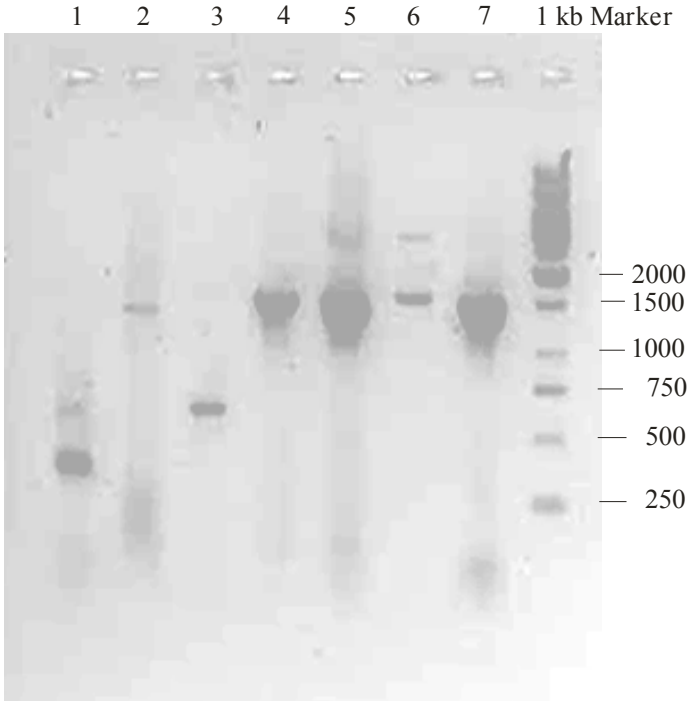


Abb. 30: Amplifizierte PCR-Fragmente

Spur 1: 3'-RACE, Spur 2: 5'-RACE (Tailing), Spur 3: 5'-RACE (RLM), Spur 4/5/6: End-to-End bei verschiedenen Temperaturen; Spur 7: Expressionsklon

Fragment	Länge	sense Primer	antisense Primer
3'-RACE	346 bp	C4HGSP1	AP/ AUAP
5'-RACE (Tailing)	1378 bp	RT: C4HGSP3 1. PCR: C4HGSP3 2. PCR: C4HGSP2	 1. PCR: AAP 2. PCR: AAP
5'-RACE (RLM)	469 bp	1. PCR: Generacer 5' 2. PCR: Generacer 5'nested	1. PCR: GeneracerC4H1 2. PCR: GeneracerC4H2
End-to-End	1623 bp	C4Hvoll5Ende	C4Hvoll3Ende
Expressionkslon	1588 bp	C4HEX5Ende	C4Hvoll3Ende

Tab. 4: Verwendete Primer im Verlauf der Klonierung der C4H

3.3.2 *Am*CYP71AJ1, *Am*CYP98A21, *Am*CYP76B8, *Am*CYP82H1

Bei diesen Sequenen konnte im Laufe der Amplifizierung in 5'-Richtung mit dem Tailing kein Fragment kloniert werden. Erst mit dem RLM-RACE gelang die Erfassung des jeweiligen Start-ATGs. Die folgende Abbildung zeigt allgemein die Fragmente, die bei der Generierung der vollständigen cDNA im RACE und bei der Erstellung des ORF amplifiziert wurden.

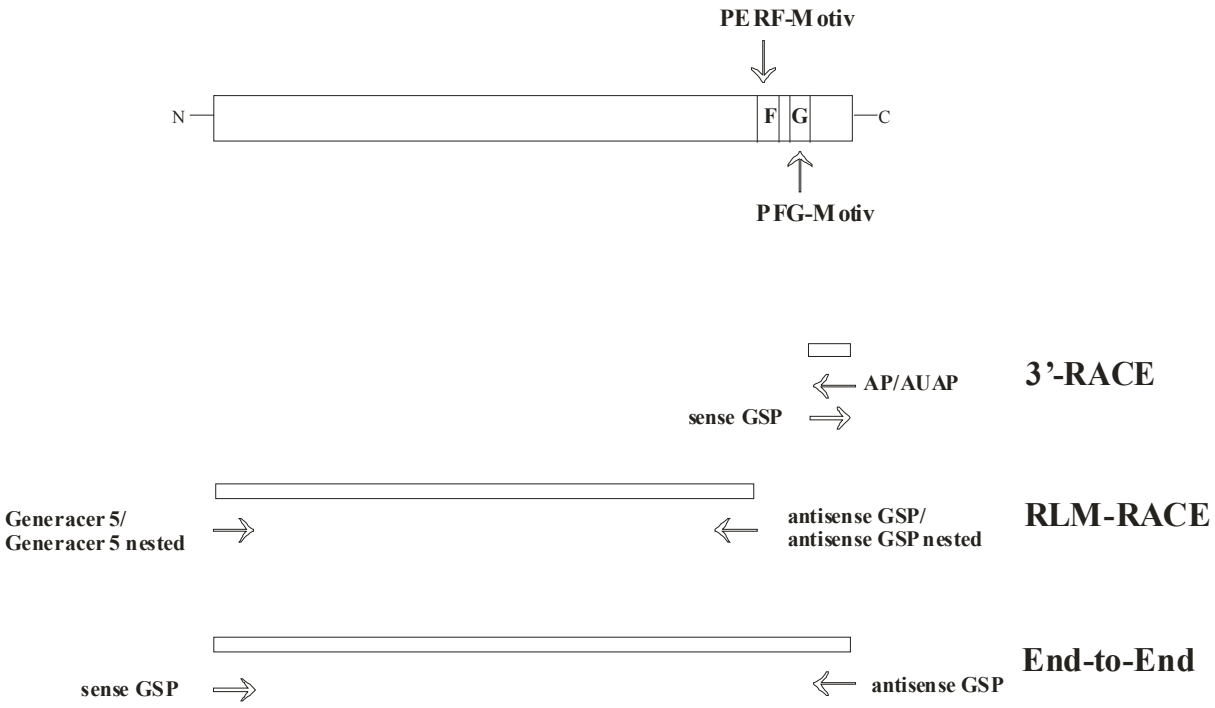


Abb. 31: Amplifizierte PCR-Fragmente und verwendete Primer im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP71AJ1, *Am*CYP98A21, *Am*CYP76B8, *Am*CYP82H1

Die folgenden Primer führten zur Klonierung von *Am*CYP71AJ1.

Fragment	Länge	sense Primer	antisense Primer
3'-RACE	386 bp	P3D39GSP1	AP/ AUAP
5'-RACE (RLM)	1423 bp	1. PCR: Generacer 5' 2. PCR: Generacer 5'nested	1. PCR: GeneracerMent1 2. PCR: GeneracerMent2
End-to-End	1661 bp	Mentvoll5	Mentvoll3
Expressionsklon	1643 bp	MentEx5Ende	Mentvoll3

Tab. 5: Amplifizierte PCR-Fragmente und verwendete Primer im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP71AJ1

Bei der Klonierung von *Am*CYP98A21 wurden die Primer der folgenden Tabelle angewendet.

Fragment	Länge	sense Primer	antisense Primer
3'-RACE	378 bp	P4D51GSP1	AP/ AUAP
5'-RACE (RLM)	1324 bp	1. PCR: Generacer 5' 2. PCR: Generacer 5'nested	1. PCR: Generacercumar1 2. PCR: Generacercumar2
End-to-End	1644 bp	Cumarvoll5	Cumarvoll3
Expressionsklon	1635 bp	CumarEx5Ende	Cumarvoll3

Tab. 6: Amplifizierte PCR-Fragmente im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP98A21

Die vollständige Sequenz von *Am*CYP76B8 wurde mit den in der Tabelle und der Sequenz angegebenen Primern amplifiziert.

Fragment	Länge	sense Primer	antisense Primer
3'-RACE	321 bp	P3D59GSP1	AP/ AUAP
5'-RACE (RLM)	1616 bp	1. PCR: Generacer 5' 2. PCR: Generacer 5'nested	1. PCR: P3D59GSP3 2. PCR: P3D59GSP2
Expressionsklon	1571 bp	Ger5Ex	Ger3Ex

Tab. 7: Amplifizierte PCR-Fragmente und verwendete Primer im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP76B8

Zur Generierung der vollständigen cDNA von *Am*CYP82H1 wurden die Primer der folgenden Tabelle verwendet.

Fragment	Länge	sense Primer	Antisense Primer
3'-RACE	313 bp	P3D38rGSP1	AP/ AUAP
5'-RACE (RLM)	1433 bp	1. PCR: Generacer 5' 2. PCR: Generacer 5'nested	1. PCR: P3D38rGSP2 2. PCR: P3D38rGSP3
Expressionsklon	1688 bp	5. Seq 5 Ex	5. Seq 3 Ex

Tab. 8: Amplifizierte PCR-Fragmente und verwendete Primer im Verlauf der Klonierung von *Am*CYP82H1

3.4 Sequenz- und Datenbankanalyse zur Identifizierung der isolierten cDNAs

3.4.1 *Am*CYP73A41 (Zimtsäure 4-Hydroxylase)

Die erste der klonierten cDNA-Sequenzen wurde an Hand von Datenbankvergleichen als wahrscheinliche Zimtsäure 4-Hydroxylase identifiziert. Die vollständige cDNA besteht aus 1623 bp, mit einem offenen Leserahmen (ORF) von 1518 Nukleotide, also 506 Aminosäuren. Das Startnukleotid (ATG) befindet sich an der Position 38, das Stopnukleotid (TAA) an Position 1555. Die folgende Abbildung zeigt die vollständige cDNA- und Polypeptidsequenz und die genaue Position der Primer.

```
                                C4HEx5Ende ACATGATGGACTTTGT
DNA: CCTTCATTCTCCTATTCTCATCCTCAACCAACAAAACATGATGGACTTTGT
 AS:                                        M  M  D  F  V
     TCTGTTAGAG>
DNA: TCTGTTAGAGAAGGCCCTGTTGGGCTTGTTCATTGCAACCATTGTAGCCAT
 AS:  L  L  E  K  A  L  L  G  L  F  I  A  T  I  V  A  I

DNA: CACTATTTCCAAGTTACGTGGCAAGAAACTCAAGCTCCCACCAGGGCCTAT
 AS:  T  I  S  K  L  R  G  K  K  L  K  L  P  P  G  P  I

DNA: CCCTGTTCCTGTGTTTGGTAACTGGTTGCAAGTTGGTGATGATCTTAACCA
 AS:  P  V  P  V  F  G  N  W  L  Q  V  G  D  D  L  N  Q

DNA: GAGGAACCTGGTGGAGTATGCCAAGAAGTTTGGTGACTTGTTTCTTTTGCG
 AS:  R  N  L  V  E  Y  A  K  K  F  G  D  L  F  L  L  R

DNA: TATGGGACAGAGGAACTTGGTCGTTGTGTCTTCTCCTGATTTGGCTAAAGA
 AS:  M  G  Q  R  N  L  V  V  V  S  S  P  D  L  A  K  D

DNA: TGTTTTGCATACACAGGGTGTTGAGTTTGGTTCACGCACTCGTAACGTTGT
 AS:  V  L  H  T  Q  G  V  E  F  G  S  R  T  R  N  V  V

DNA: TTTCGATATCTTCACTGGCAAGGGACAGGACATGGTTTTCACGGTCTACAG
 AS:  F  D  I  F  T  G  K  G  Q  D  M  V  F  T  V  Y  S

DNA: TGAGCATTGGAGGAAGATGAGGAGAATCATGACAGTACCTTTCTTTACCAA
 AS:  E  H  W  R  K  M  R  R  I  M  T  V  P  F  F  T  N
```

```
          GeneracerC4H2<GCTAAACCCACCCTCCTACTCCGACG
DNA: CAAAGTTGTGCAGCAGTATCGATTTGGGTGGGAGGATGAGGCTGCCCGTGT
 AS:  K  V  V  Q  Q  Y  R  F  G  W  E  D  E  A  A  R  V

                     <GGTTAGGACTCCGACGATGGTTACC GeneracerC4H1
DNA: TGTTGAGGATGTTAAGGCCAATCCTGAGGCTGCTACCAATGGGATCGTGTT
 AS:  V  E  D  V  K  A  N  P  E  A  A  T  N  G  I  V  L

DNA: GAGGAACCGACTGCAGTTGCTCATGTACAATAATATGTACAGAATTATGTT
 AS:  R  N  R  L  Q  L  L  M  Y  N  N  M  Y  R  I  M  F

DNA: TGATAGAAGGTTTGAGAGTGTAGATGATCCTTTATTCTTGAAGCTTAAGGC
 AS:  D  R  R  F  E  S  V  D  D  P  L  F  L  K  L  K  A

DNA: ATTGAATGGGGAGCGTAGTAGACTTGCTCAGAGCTTTGAGTACAATTTCGG
 AS:  L  N  G  E  R  S  R  L  A  Q  S  F  E  Y  N  F  G

DNA: AGATTTTATCCCTATTCTTCGCCCTTTCTTGAGAGGTTATCTTAAACTTTG
 AS:  D  F  I  P  I  L  R  P  F  L  R  G  Y  L  K  L  C

DNA: CCAGGAAATCAAGGACAAAAGATTGAAGCTCTTTAAGGATTATTTCGTGGA
 AS:  Q  E  I  K  D  K  R  L  K  L  F  K  D  Y  F  V  D

DNA: CGAGAGGAAGAAGCTTGAAAGCATAAAGAGCGTAGGTAACAACAGCTTGAA
 AS:  E  R  K  K  L  E  S  I  K  S  V  G  N  N  S  L  K

DNA: GTGCGCCATTGATCACATCATAGAAGCTCAGGAAAAAGGAGAGATCAATGA
 AS:  C  A  I  D  H  I  I  E  A  Q  E  K  G  E  I  N  E

DNA: GGACAACGTTCTTTACATTGTTGAAAACATTAATGTYGCTGCAATTGAAAC
 AS:  D  N  V  L  Y  I  V  E  N  I  N  V  A  A  I  E  T

DNA: AACACTATGGTCAATTGAATGGGGCATTGCGGAATTAGTTAATAACCCTGA
 AS:  T  L  W  S  I  E  W  G  I  A  E  L  V  N  N  P  E

DNA: AATCCAGAAGAAGCTGAGGCATGAGTTAGACACTGTGCTTGGGGCTGGAGT
 AS:  I  Q  K  K  L  R  H  E  L  D  T  V  L  G  A  G  V

DNA: TCAGATCTGTGAGCCAGACGTCCAGAAGCTCCCTTACCTTCAAGCTGTGAT
 AS:  Q  I  C  E  P  D  V  Q  K  L  P  Y  L  Q  A  V  I

DNA: CAAAGAGACTCTTCGATACAGAATGGCCATTCCTCTTTTAGTCCCTCACAT
 AS:  K  E  T  L  R  Y  R  M  A  I  P  L  L  V  P  H  M

DNA: GAACCTTCATGAAGCAAAGCTTGCGGGTTATGACATCCCGGCAGAGAGCAA
 AS:  N  L  H  E  A  K  L  A  G  Y  D  I  P  A  E  S  K

DNA: AATCTTGGTCAATGCATGGTGGCTTGCCAACAATCCCGCTCACTGGAATAA
 AS:  I  L  V  N  A  W  W  L  A  N  N  P  A  H  W  N  K

DNA: ACCAGATGAGTTTAGGCCTGAGAGGTTCTTGGAAGAAGAATCAAAAGTTGA
 AS:  P  D  E  F  R  P  E  R  F  L  E  E  E  S  K  V  E

                                  <GGTAAGCCTCAGCCCTCCTCTTCG
                              C4HGSP1 ATTCGGAGTCGGGAGGAGAAGC>
DNA: GGCTAATGGAAATGATTTCAAGTACATACCATTCGGAGTCGGGAGGAGAAG
 AS:  A  N  G  N  D  F  K  Y  I  P  F  G  V  G  R  R  S

     G C4HGSP2          <CGTAACGGATAGGACCCATAGC C4HGSP3
DNA: CTGCCCTGGAATTATCCTTGCATTGCCTATCCTGGGTATCGTAATCGGACG
 AS:  C  P  G  I  I  L  A  L  P  I  L  G  I  V  I  G  R
```

```
DNA: TTTGGTGCAGAACTTTGAGCTCTTGCCTCCTCCTGGACAGTCTAAGATTGA
 AS:  L  V  Q  N  F  E  L  L  P  P  P  G  Q  S  K  I  D

DNA: TACAGCAGAGAAAGGAGGACAGTTCAGTCTTCAAATTTTGAAGCACTCCAC
 AS:  T  A  E  K  G  G  Q  F  S  L  Q  I  L  K  H  S  T

DNA: TATCGTTTGCAAGCCAAGATCATCTTAATAATATTCGTCTCCTCTACGTTT
 AS:  I  V  C  K  P  R  S  S  *

                      <CCACCTGAACTATGGTAATATGG C4Hvoll3Ende
DNA: ACATTTGATTGTAAAATTGGGTGGACTTGATACCATTATACC
```

Abb. 32: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz der C4H (CYP73A41, AY219918) aus *Ammi majus* L.

Ein Sequenzvergleich (Abb. 33) mit den Aminsoäuresequenzen bekannter C4Hs aus verschiedenen Pflanzen ergab eine überraschend hohe Homologie des codierenden Bereiches zu der C4H aus *Petroselinum crispum* (CYP73A10; Koopmann *et al*., 1999), ebenfalls einer Apiaceae. Der ORF der C4H von *Ammi majus* (CYP73A41) hat auf Proteinebene 99,6 % Ähnlichkeit und 98,6 % Identität mit CYP73A10. Wegen der überraschend hohen Sequenzidentität wurde die *Ammi majus* Sequenz nochmal bestätigt, indem RNA aus jungen Keimlingen als Template eingesetzt wurde. Bemerkenswert ist, dass P450-Gene mit einer Sequenzidentität von über 97 % als allelische Varianten betrachtet werden (Nelson *et al*., 1996). Im Vergleich dazu erreichen die vier bisher aus Fabaceae identifizierten C4Hs eine maximale Homologie von 91 %. Auch zwei aus *Lithospermum erythrorhizon* isolierte C4Hs besitzen nur 91 % Homologie (Yamamura *et al*., 2001), und zwei aus *Citrus sinensis* Osbeck isolierte C4Hs zeigten nur 66 % Identität (Betz *et al.*, 2001). Die Homologie zu CYP73A32 aus *Ruta graveolens*, einer Pflanze, die ebenfalls Psoralenen bildet beträgt auf Proteinebene nur 84 %.

```
CYP73A41    MMDFVLLEKALLGLFIATIVAITISKLRGKKLKLPPGPIPVPVFGNWLQVGDDLNQRNLV  60
CYP73A10    ------------------------------------------------------------  60
Konsensus   MMDLLLLEKTLLALFIAAIVAITISKLRGKKFKLPPGPIPVPIFGNWLQVGDDLNHRNLT

CYP73A41    EYAKKFGDLFLLRMGQRNLVVVSSPDLAKDVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF 120
CYP73A10    D---------M--------------E---------------------------------- 120
Konsensus   DLAKKFGDIFLLRMGQRNLVVVSSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF

CYP73A41    TVYSEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRFGWEDEAARVVEDVKANPEAATNGIVLRNRLQ 180
CYP73A10    ------------------------------------------------------------ 180
Konsensus   TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRFGWESEAASVVEDVKKNPEAATNGIVLRRRLQ

CYP73A41    LLMYNNMYRIMFDRRFESVDDPLFLKLKALNGERSRLAQSFEYNFGDFIPILRPFLRGYL 240
CYP73A10    -------------------------------------------H---------------- 240
Konsensus   LMMYNNMYRIMFDRRFESEDDPLFVKLKALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFL GYL
```

```
CYP73A41    KLCQEIKDKRLKLFKDYFVDERKKLESIKSVGNNSLKCAIDHIIEAQEKGEINEDNVLYI 300
CYP73A10    ------------------------------D---------------Q------------ 300
Konsensus   K CKEVKDRRLQLFKDYFVDERKKLGSTKSTDNNGLKCAIDHILDAQ KGEINEDNVLYI

CYP73A41    VENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNNPEIQKKLRHELDTVLGAGVQICEPDVQKLPYLQA 360
CYP73A10    ------------------------------------------------------------ 360
Konsensus   VENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQKKLRHELDTVLGPG QVTEPDLQKLPYLQA

CYP73A41    VIKETLRYRMAIPLLVPHMNLHEAKLAGYDIPAESKILVNAWWLANNPAHWNKPDEFRPE 420
CYP73A10    -----------------------D------------------------------------ 420
Konsensus   VIKETLRLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGGYDIPAESKILVNAWWLANNPAHWKKPEEFRPE

CYP73A41    RFLEEESKVEANGNDFKYIPFGVGRRSCPGIILALPILGIVIGRLVQNFELLPPPGQSKI 480
CYP73A10    ------------------------------------------------------------ 480
Konsensus   RFLEEESKVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITIGRLVQNFELLPPPGQSKI

CYP73A41    DTAEKGGQFSLQILKHSTIVCKPRSS 506
CYP73A10    -------------------------- 506
Konsensus   DTSEKGGQFSLHILKHSTIVAKPRSF
```

Abb. 33: Sequenzvergleich von *Ammi majus* CYP73A41 und *Petroselinum crispum* CYP73A10

Die hoch konservierten Motive sind grau unterlegt und der Konsensus ist angegeben. Der Konsensus wurde aus den folgenden CYP73 gebildet:
CYP73A1 (*Helianthus tuberosus*), CYP73A3 (*Medicago sativa*), CYP73A4 (*Catharanthus roseus*), CYP73A5 (*Arabidopsis thaliana*), CYP73A9 (*Pisum sativum*), CYP73A11 (*Glycine max*), CYP73A12 (*Zinnia elegans*), CYP73A10 (*Petroselinum crispum*), CYP73A14 (*Glycyrrhiza echinata*), CYP73A16 (*Populus kitakamiensis*), CYP73A19 (*Cicer arietinum*), CYP73A41 (*Ammi majus*)

Die Kernstruktur von Cyt P450 besteht aus den Helices D, E, I, J, K, L und der Hämbindungsregion. Die Sequenzanalyse der fünf isolierten cDNAs zeigte bei allen die für Cyt P450 typischen konservierten Motive. Sie sollen in ihrer Reihenfolge des Auftretens vom N-Terminus zum C-Terminus besprochen werden. Nahe dem N-Terminus befindet sich der hydrophobe Membrananker, der den eukaryotische membrangebundenen Cyt P450 zur Verankerung im ER dient. Es schließt sich die Prolinreiche Region mit der Konsensussequenz [PPGPxGxP] an, die für die richtige Konformation und die notwendige Flexibilität zwischen dem Membrananker und dem globulären Teil sorgt. Die Sauerstoffbindungsregion mit der Konsensussequenz [(A/G)Gx(D/E)**T**(T/S)] befindet sich im zentralen Teil der I-Helix und ist wichtig für den Protronentransfer von der Proteinoberfläche zum ans Eisen gebundenen reduziertem Sauerstoff. Diese Region weist bei CYP73A41 wie auch in anderen Enzymen der Familie CYP73 Besonderheiten auf, die von Schalk *et al.* (1999) bei CYP73A1 entdeckt worden sind. Ausgehend vom hochkonservierten Threonin befindet sich hier, wie auch bei CYP73A41 an den Positionen T - 3 und T - 4 ein Alanin. Substitutionen durch „site-directed mutagenesis“ haben bis zur Inaktivierung des Enzyms geführt. Die genaue Position des 307-

308Ala-Ala-Motivs variiert in den verschiedenen Enzymen der Familie CYP73A. So befindet sich das Alanindipeptid in *Ammi majus* bei den Aminosäuren 307-308, bei *Cicer arietinum* bei 305-306. Am höchsten konserviert ist die Hämbindungsregion mit der Konsensussequenz [PFGxGRRx**C**xG]. Das Cystein bindet kovalent das Häm, und diese Schwefel-Eisen-Bindung wird von einer Tasche umhüllt. Am N-terminalen Bereich der Tasche (C-7) befindet sich das Phenylalanin, am C-terminalen (C+2) das Glycin. Die Position C+1 ist die zweite der beiden ungewöhnlichen Regionen von *Helianthus tuberosus* CYP73A1 (Schalk *et al*., 1999). An dieser Position ist in vielen pflanzlichen Cyt P450 ein Prolin zu finden, was in tierischen Cyt P450 nicht der Fall ist. Substitutionen von Pro 448 in CYP73A1 durch „site-directed mutagenesis“ haben gezeigt, dass die Mutanten weniger aktiv waren und die Häm-Protein-Interaktion gestört war. Die Position C+1 scheint also eine wichtige Rolle bei der korrekten Orientierung des Häms sowie der Faltung und der Stabilität des Proteins zu spielen. Auch bei CYP73A41 ist das Prolin an der Position C+1 zu finden. Die relative Lage des Motivs wurde in der Familie CYP73 näher betrachtet und richtet sich nach der Position des Cysteins:

Pro 450: *Ammi majus*

Pro 449: *Medicago sativa*, *Glycine max*

Pro 448: *Arabidopsis thaliana*, *Catharanthus roseus*, *Populus kitamasiensis*, *Pisum sativum*, *Glycyrrhiza echinata*, *Helianthus tuberosus, Zinnia elegans*

Pro 447: *Cicer arietinum*

Vor kurzem haben Schoch *et al*. (2003) bedeutende Aminosäuren im aktiven Zentrum von CYP73A41 entdeckt, die eine Schlüsselrolle bei der Substraterkennung spielen. N302 und I371 sind von großer Bedeutung bei der Substratbindung und der Orientierung für die Katalyse. Zusammen mit A306 bilden sie eine hydrophobe Tasche zur Positionierung des aromatischen Ringes. Über N302 in der I-Helix scheint die Carboxylgruppe der Zimtsäure zu binden, und K484 soll ebenfalls an der Substratbindung beteiligt sein. Diese Aminsäuren sind in *Am*CYP73A41 alle vorhanden, jedoch um eine Postition verschoben: N303, I372, K485.

3.4.2 *Am*CYP71AJ1

Die zweite klonierte Sequenz *Am*CYP71AJ1 besitzt eine Gesamtlänge von 1811 Nukleotiden. Die Länge für den größtmöglichen ORF beträgt 1482 bp mit 21 bp für den 5’ flankierenden Bereich und 307 bp für den 3’ flankierenden Bereich. Dies ergibt ein Protein mit 494 Aminosäuren. Da am N-terminalen Ende zwei Methionine kurz hintereinander folgen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau festgelegt werden, welches davon das Start-Methionin ist.

Man geht jedoch davon aus, dass die Translation mit dem ersten ATG im Leseraster beginnt (Kozak, 1989). Die unten stehende Abbildung zeigt die Nukleotid- und abgeleitete Polypeptidsequenz und die genaue Lage der verwendeten Primer.

```
     GCAGAGTGCAGAGCAATAGAAATGAAGATG> Mentvoll5
           MentEx5Ende GAAATGAAGATGCTGGAACAGAATCC>
DNA: GCAGAGTGCAGAGCAATAGAAATGAAGATGCTGGAACAGAATCCCCAGTAC
 AS:                      M  K  M  L  E  Q  N  P  Q  Y

DNA: CTGTATTTTTCATTGTTTCTTGTCACAATATTTCTCTACAAATGGTTAACA
 AS: L  Y  F  S  L  F  L  V  T  I  F  L  Y  K  W  L  T

DNA: CTTAAGAAAACACCCTTGAAAAATCTGCCACCTTCTCCACCACAATATCCC
 AS: L  K  K  T  P  L  K  N  L  P  P  S  P  P  Q  Y  P

DNA: ATAATTGGAAACCTTCATCAAATTGGTCCAGACCCGCAAGCATCACTCAGA
 AS: I  I  G  N  L  H  Q  I  G  P  D  P  Q  A  S  L  R

DNA: GACTTGGCTCAAAAGTATGGTCCTCTAATGTTTCTTAAGTTTGGGACTGTA
 AS: D  L  A  Q  K  Y  G  P  L  M  F  L  K  F  G  T  V

DNA: CCTGTTCTTGTTGTTTCTTCAGCTGATGCAGCTCGTGAGGCTTTGAAAACC
 AS: P  V  L  V  V  S  S  A  D  A  A  R  E  A  L  K  T

DNA: CATGATCTTGTTTTCGCAGACCGACCTTATTCAAGTGTGGCCAACAAAATC
 AS: H  D  L  V  F  A  D  R  P  Y  S  S  V  A  N  K  I

DNA: TTCTACAATGGCAAGGACATGGTGTTTGCTCGTTACACTGAATATTGGAGA
 AS: F  Y  N  G  K  D  M  V  F  A  R  Y  T  E  Y  W  R

DNA: CAAGTAAAGAGTATCTGCGTTACTCAGCTCCTAAGTAACAAAAGGGTTAAT
 AS: Q  V  K  S  I  C  V  T  Q  L  L  S  N  K  R  V  N

DNA: TCTTTTCACTATGTCAGAGAAGAAGAAGTTGATCTTTTAGTCCAAAATCTC
 AS: S  F  H  Y  V  R  E  E  E  V  D  L  L  V  Q  N  L

DNA: GAAAATTCTCATTCGAAAGTAGCAAATTTAACTGAACTGTTAATCGAAGTA
 AS: E  N  S  H  S  K  V  A  N  L  T  E  L  L  I  E  V

DNA: ACTGGCAATGTAGTCTGCAGGGTTTCAGTAGGAAGTGGTGACAAAGTGGAT
 AS: T  G  N  V  V  C  R  V  S  V  G  S  G  D  K  V  D

DNA: TCATACAAGATTTTAATTCTGGAAATAATGGATATGTTAGGCTATTCCCGC
 AS: S  Y  K  I  L  I  L  E  I  M  D  M  L  G  Y  S  R

DNA: AGCATAGAGGATTTTTTTCCATTGCTCGGTTGGGTTGATTGGCTTACTGGA
 AS: S  I  E  D  F  F  P  L  L  G  W  V  D  W  L  T  G

DNA: TTGAGGGGAAAGGTTGCGGAAGCAGCCAAAGGGTTTGATACTTTTCTGGAA
 AS: L  R  G  K  V  A  E  A  A  K  G  F  D  T  F  L  E

DNA: GGTGTTCTTAAAGAACATCTAAGTACTACTGGATCCAAATACAATGACTTT
 AS: G  V  L  K  E  H  L  S  T  T  G  S  K  Y  N  D  F

DNA: GTATCCATTTTGCTTGAGATTCAGGAGGCAGATGCTGGCTCTTCTATGGAT
 AS: V  S  I  L  L  E  I  Q  E  A  D  A  G  S  S  M  D

DNA: AATGAATGTATCAAATCTCTTATCTGGGATATGTTGGGTGCCGGGACTGAA
 AS: N  E  C  I  K  S  L  I  W  D  M  L  G  A  G  T  E
```

```
DNA: ACAATATCGACAGCTTTGGAGTGGACACTAGCAGCGCTAATAAAAAATCCG
 AS: T  I  S  T  A  L  E  W  T  L  A  A  L  I  K  N  P

DNA: GACGCCATGTTCAAATTGCAAAATGAGGTCAGAGAAATTGGCAAAGGCAAA
 AS: D  A  M  F  K  L  Q  N  E  V  R  E  I  G  K  G  K

DNA: TCAAAGATATCAGAGGCTGATCTAGTCAAAATGAACTACCTGCAAGCAGTA
 AS: S  K  I  S  E  A  D  L  V  K  M  N  Y  L  Q  A  V

DNA: ATGAAAGAGAGCATGCGATTGTATTTTACAGCCCCACTACTAGTTCCTAGA
 AS: M  K  E  S  M  R  L  Y  F  T  A  P  L  L  V  P  R

DNA: GAAGCGAGGCAGGACATGAAATTTATGGGGTATGACATAAGCTCAGGAACA
 AS: E  A  R  Q  D  M  K  F  M  G  Y  D  I  S  S  G  T

DNA: CAAGTACTGATAAATGCATGGGCAATTGCAAGAGACCCTTTATTGTGGGAC
 AS: Q  V  L  I  N  A  W  A  I  A  R  D  P  L  L  W  D

DNA: AAACCAGAGGAGTTCCGGCCTGAGAGGTTCTTGAATAGTCCTATTGATTAC
 AS: K  P  E  E  F  R  P  E  R  F  L  N  S  P  I  D  Y

DNA: AAAGGCTTTCACTATGAGTTTCTTCCCTTTGGAGCCGGTCGGAGGGGTTGT
 AS: K  G  F  H  Y  E  F  L  P  F  G  A  G  R  R  G  C

DNA: CCTGGTATCCAGTTTGCAATGTGTATTAATGAGCTTGTAGTGGCAAATCTT
 AS: P  G  I  Q  F  A  M  C  I  N  E  L  V  V  A  N  L

                                                 P3D39GSP1 G
       GeneracerMent2 <GCTTAACGGACTACCCTTTTCTAACCTTC   <C
DNA: GTGCACAAGTTTAATTTCGAATTGCCTGATGGGAAAAGATTGGAAGATTTG
 AS: V  H  K  F  N  F  E  L  P  D  G  K  R  L  E  D  L

     GATATGACTGCTGCCAGTGGCATTAC>
     CTATACTGACGACGGTCACCGTAATG GeneracerMent1
DNA: GATATGACTGCTGCCAGTGGCATTACTCTTCGTAAAAAATCTCCTCTCTTG
 AS: D  M  T  A  A  S  G  I  T  L  R  K  K  S  P  L  L

DNA: GTGGTTGCCAGACCACATGTTTGATTCTTAATTTTCACTTGCAGTTGCTTT
 AS: V  V  A  R  P  H  V

DNA: GGGGATGCATGCAACTGAAGACTCCTTTTGCCTTGATAGATTATCTTTTAC

DNA: TCAAACTTGTTCTATTAGCCTATAAATAAAATGTTAATGAAGGCCAGCCTT

        <GGTACAGTTATGAGTAAGGGCTGAG Mentvoll3
DNA: CATGCCATGTCAATACTCATTCCCAGCTCAAAATTTCCTCAACTCTGCATA

DNA: AAGCAACATTTTGTAAGGCTAAGAGAGGCCTTCGGGCATTCTCCACCACCT

DNA: TATGATTCTATCCATTAAGTGTAATATGTGCTATCAATTTATGTAAAACTG

DNA: CAAGGATCTAATTACATTTCTATACA
```

Abb. 34: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz von CYP71AJ1 aus *Ammi majus* L.

*Am*CYP71AJ1 hat ebenfalls alle wichtigen konservierten Regionen von pflanzlichen Cyt P450, nämlich die prolinreiche Region, das [-EEFxPERF-]-Motiv und die

Hämbindungsregion. Die Sauerstoffbindungsregion [(A/G)Gx(D/E)**T**(T/S)] ist ebenfalls vorhanden, jedoch entspricht die letzte Aminosäure (I317) nicht der Konsensussequenz.

Datenbankrecherchen zeigen eine relativ hohe Ähnlichkeit (66 %) der Aminosäuresequenz mit der Menthofuransynthase (MFS) aus *Mentha* x *piperita* (Q947B7, Bertea *et al*, 2001) an.

```
CYP71AJ1   METKMETLEQNPQYLYFSLFLVTIFLYKWLTLKKTPLKNLPPSPPQYPIIGNLHQIGPDP 60
MFS        -------MAALLVFFSVSLILLAVLFHKRKSSLSS-RKRPPPSPLRLPVIGHFHLIGALS 52
                  :     :: .**:*::::::*  :  .:  *. **** : *:**::* **. .
                                                 PPxPxxxP

CYP71AJ1   QASLRDLAQKYGPLMETFLKFGTVPVLVVSSADAAREALKTHDLVFADRPYSSVANKIFY 120
MFS        HRSFTSLSKRYGEVML--LHFGSAPVLVASSAAAAREIMKNQDVIFASRPRLSIFDRLMY 110
           : *: .*:::** :*   *:**:.****.*** **** :*.:*::**.**  *: ::::*

CYP71AJ1   NGKDMETVFARYTEYWRQVKSICVTQLLSNKRVNSFHYVREEEVDLLVQNLENS-HSKVA 179
MFS        SGK--GVAFAPYGEHWRNARSMCMLQLLSAKRVQSFGGIREEETSAMIEKIRRSKPTTVV 168
           .**   ..** * *:**:.:*:*: **** ***:**  :****.. :::::::.*  :.*.

CYP71AJ1   NLTELLIEVTGNVVCRVSVG-SGDKVDSYKILILEIMETDMETLGYSRSIEDFFPLLGWV 238
MFS        NLSEMFMALTNGVIHRAVLGRKGDGGDDFNRILIKVIK----LLG-SFNVGDYVPWLSWI 223
           **:*::: :*..*: *. :* .**  *.:: :::::::     ** * .: *:.* *.*:

CYP71AJ1   DWLTGLRGKVAEAAKGFDTFLEGVLKEHLS-TTGSKYNDFVSILLEIQEADAGSSMETDN 297
MFS        NRINGVDAEVEKVGTKLDGSMEGILRKYRRKKVGDDETNFVDTLLQFQRESK-DTDPVED 282
           : :.*: .:* :... :*  :**:*:::   ..*.. .:**. **::*. .  .:  .::

CYP71AJ1   ECIKSLIWDMETLGAGTETISTALEWTLAALIKNPDAMETFKLQNEVREIGKGKSKISEA 357
MFS        DVIKALIFDMVS--AGTDTTFAALEWTMAELIKNPRTLKT--LQNEVREVSRNKGGITED 338
           : **:**:** :  ***:*  :*****:* ***** :::*  *******:.:.*. *:*
                         AGxDTT

CYP71AJ1   DLVKMETNYLQAVMETKESMETRLYFTAPLLVPREARQDMETKFMETGYDISSGTQVLIN 417
MFS        DVDKMP--YLKAVSK----EILRLHPPFAILLPRELTQDAN----MLGYDIPRGTVVLVN 388
           *: **   **:** :       **: . .:*:***  ** :      ****. ** **:*

CYP71AJ1   AWAIARDPLLWDKPEEFRPERFLNSPIDYKGFHYEFLPFGAGRRGCPGIQFAMETCINEL 477
MFS        NWAISRDPSLWENPEEFRPERFLETSIDYKGLHFEMLPFGSGRRGCPGSTFAMA--LYEL 446
            ***:*** **::**********::.*****:*:*:****:*******  ***   : **
                         EEFxPERF               PFGxGRRxCxG

CYP71AJ1   VVANLVHKFNFELPDGKRLEDLDMETTAASGITLRKKSPLLVVARPHV- 525
MFS        ALSKLVNEFDFRLGNGDRAEDLDMT--EAPGFVVHKKSPLLVLATPRQS 493
           .:::**::*:*.* :*.* *****    *.*:.::*******:* *:
```

Abb. 35: Sequenzvergleich der *Mentha piperita* Menthofuransynthase (MFS) aus *Mentha* x *piperita* mit *Am*CYP71AJ1

Sterne (*) kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte (.) markieren konservierte Austausche von Aminosäuren

Das Produkt Menthofuran und das Substrat (+)-Pulegon der Menthofuransynthase sind bisher nicht aus *Ammi majus* beschrieben worden (Ivie, 1978). Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass dieses Enzym eine andere physiologische Funktion hat und möglicherweise eine Reaktion mit verwandtem Mechanismus (oxidativer Ringschluß) katalysiert.

3.4.3 *Am*CYP98A21

Die dritte cDNA-Sequenz überspannte 1707 bp mit dem vermutlichen Start in bp 11 und einem offenen Leserahmen von 1558 Nukleotiden. Die Sequenz codiert somit ein Polypeptid von 516 Aminosäuren. Die folgende Abbildung zeigt die vollständige Sequenz von *Am*CYP98A21 mit den wesentlichen Primern.

```
      GTCTTGTAACATGGCTCTCTTCC> Cumarvoll5
CumarEx5Ende ACATGGCTCTCTTCCTCTACCTG>
DNA: GTCTTGTAACATGGCTCTCTTCCTCTACCTGATCATCCCTTGCACCATAAT
 AS:           M  A  L  F  L  Y  L  I  I  P  C  T  I  I

DNA: CCTCCTCCACCAGCTCTACCACAAGCTAAGATTCAAGCTCCCACCCGGCCC
 AS:  L  L  H  Q  L  Y  H  K  L  R  F  K  L  P  P  G  P

DNA: TCGTCCATGGCCTATCGTAGGCAATCTTTACGACATCGAACCGGTGAGGTT
 AS:  R  P  W  P  I  V  G  N  L  Y  D  I  E  P  V  R  F

DNA: CCGGTGCTTCAACAACTGGTCCAAGACTTATGGTCCTATAATATCAGTTTG
 AS:  R  C  F  N  N  W  S  K  T  Y  G  P  I  I  S  V  W

DNA: GTTTGGATCAACTCTGAATGTTATTGTGAATAACACTGAGCTAGCTAAAGA
 AS:  F  G  S  T  L  N  V  I  V  N  N  T  E  L  A  K  E

DNA: AGTGTTGAAAGACAAGGATCAACAGCTGGCTGATCGGCATCGAAGCCGATC
 AS:  V  L  K  D  K  D  Q  Q  L  A  D  R  H  R  S  R  S

DNA: AGCAGCTAAGTTTAGTAGAGATGGCCAGGATTTAATATGGGCTGATTATGG
 AS:  A  A  K  F  S  R  D  G  Q  D  L  I  W  A  D  Y  G

DNA: ACCTCATTATGTTAAGGTTAGGAAAGTTTGTACACTTGAGCTGTTTACTCC
 AS:  P  H  Y  V  K  V  R  K  V  C  T  L  E  L  F  T  P

DNA: TAAGAGACTTGAAGCTATCAGGCCTGTTAGAGAAGATGAAGTTACTGCTAT
 AS:  K  R  L  E  A  I  R  P  V  R  E  D  E  V  T  A  M

DNA: GGTGGAATCCATTTACAAAGATTGTACTAACTCAGATACGATAGGGAAAAG
 AS:  V  E  S  I  Y  K  D  C  T  N  S  D  T  I  G  K  S

DNA: TTTGCTGGTGAGGCAGTATCTAGGAGGTGTTGCATTCAACAACATCACCAG
 AS:  L  L  V  R  Q  Y  L  G  G  V  A  F  N  N  I  T  R

DNA: GCTTGCTTTTGGAAAACGATTCGTGAACTCGGAGGGGGTGATGGATGAGCA
 AS:  L  A  F  G  K  R  F  V  N  S  E  G  V  M  D  E  Q

DNA: AGGCAAGGAGTTCAAGTCTATTATTGCTAATGGTCTAAAACTTGGTGCCTC
 AS:  G  K  E  F  K  S  I  I  A  N  G  L  K  L  G  A  S

DNA: TCTTGCAACAGCTGAGCACATTCAATGGCTCCGATGGTTGTTTCCACTGGA
 AS:  L  A  T  A  E  H  I  Q  W  L  R  W  L  F  P  L  E

DNA: AGAGGAAGCATTTGCAAAACATGGAGCGCGCAGGGATAATCTCACTCGTGC
 AS:  E  E  A  F  A  K  H  G  A  R  R  D  N  L  T  R  A

DNA: CATCATGGAAGAACACACTCTTGCTCGCCAAAAGTCCGGTGGCACCAAACA
 AS:  I  M  E  E  H  T  L  A  R  Q  K  S  G  G  T  K  Q

DNA: ACATTTTGTTGATGCATTGCTCACCCTTCAATCTAAATATGACCTTAGTGA
 AS:  H  F  V  D  A  L  L  T  L  Q  S  K  Y  D  L  S  E
```

```
DNA: GGACACCATTATTGGTCTACTTTGGGATATGATTACGGCAGGAGCGGACAC
 AS:  D  T  I  I  G  L  L  W  D  M  I  T  A  G  A  D  T

DNA: AACTGCAATTGTAGTAGAATGGGGCATGGCAGAACTCATTAAGAACCCAAG
 AS:  T  A  I  V  V  E  W  G  M  A  E  L  I  K  N  P  R

DNA: GGTGCAAGAAAAAGCCCAAGAGGAGCTTGACCGTGTAATAGGATATGAGCG
 AS:  V  Q  E  K  A  Q  E  E  L  D  R  V  I  G  Y  E  R

DNA: TGTGTTAACTGAACTGGATTTCTCGAATCTCCCCTACCTTCAATGTGTGGC
 AS:  V  L  T  E  L  D  F  S  N  L  P  Y  L  Q  C  V  A

DNA: TAAAGAGGCTCTACGACTACATCCCCCAACTCCCCTCATGCTCCCACACCG
 AS:  K  E  A  L  R  L  H  P  P  T  P  L  M  L  P  H  R

DNA: TGCCAATGCCAATGTCAAAATAGGTGGATATGACATTCCCAAGGGTTCAAA
 AS:  A  N  A  N  V  K  I  G  G  Y  D  I  P  K  G  S  N

DNA: TGTGCATGTAAACGTATGGGCCGTGGCTCGTGACCCTGCTGTTTGGAAAAA
 AS:  V  H  V  N  V  W  A  V  A  R  D  P  A  V  W  K  N

DNA: TCCATTAGAGTTCAGGCCTGAACGGTTCTTAGAGGAGGATGTTGACATGAA
 AS:  P  L  E  F  R  P  E  R  F  L  E  E  D  V  D  M  K

                          <GGTAAGCCTCGACCTTCTTCTCAAAGG GeneracerCumar2
DNA: AGGGCATGATTATCGTCTACTACCATTCGGAGCTGGAAGAAGAGTTTGCCC
 AS:  G  H  D  Y  R  L  L  P  F  G  A  G  R  R  V  C  P

       <CCGTGTTAATCCCTAGTTGAACC P4D51GSP2
        GGCACAATTAGGGATCAACTTGG>P4D5GSP1    <CCAGTAGAGAA
DNA: TGAGGCACAATTAGGGATCAACTTGGTAACATCAATGTTGGGTCATCTCTT
 AS:  E  A  Q  L  G  I  N  L  V  T  S  M  L  G  H  L  L

     CGAGGTGATGAGTAC GeneracerCumar1
DNA: GCACCACTACTCATGGGCACCACCTAGCGGGTTGAGCTCAGATGAGATTGA
 AS:  H  H  Y  S  W  A  P  P  S  G  L  S  S  D  E  I  D

                                                      <C
DNA: CATGTCAGAGAGCCCTGGAATGGTGACTTACATGAAAAACACCCCTGCAAG
 AS:  M  S  E  S  P  G  M  V  T  Y  M  K  N  T  P  A  S

     GACAAGGTTGTGGCTCCAACG P4D51GSP3
DNA: CTGTTCCAACACCGAGGTTGCCAAGTCAGTTGTACAAACGTTTGGCAGTGG
 AS:  C  S  N  T  E  V  A  K  S  V  V  Q  T  F  G  S  G

DNA: AGGACATGTAATGTCTTCTTCATATGTCTAAGATATCACACTGTTAGCTCT
 AS:  G  H  V  M  S  S  S  Y  V

                                                 <GGTGAACT
DNA: ATATAATGCTTTTTTGATAATTGGAGTCTGTGTTGGTGTTCTTCCACTTGA

     TGGACCAATGTC Cumarvoll3
DNA: ACCTGGTTACAGTTTTATGTTACAAACAATGTATGTTCTTAAAGCCTTTGT

DNA: AAGTATGAAGGTAACGCGTTAACT
```

Abb. 36: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz von CYP98A21 aus *Ammi majus* L.

Der Klon zeigt auf Aminosäureebene 83 % Identität und 92 % Ähnlichkeit mit der *Ocimum basilicum* 4-Cumaroylshikimat 3'-Hydroxylase Isoform 1 aus *Ocimum basilicum* (Q8L5H8, Gang und Pichersky, eingereicht 2002). Weiterhin besteht 78 % Identität und 88 % Ähnlichkeit mit der 4-Coumarat 3-Hydroxylase aus *Pinus taeda* (Q8VZH6, Anterola *et al*., 2001) und 66 % Identität und 81 % Ähnlichkeit mit der 4-Cumarat 3-Hydroxylase aus *Sesamum indicum* (Q8VWQ9, Ichikawa *et al*., 2001). Die Homologie zu anderen bekannten Cyt P450 liegt bei maximal 36 % Identität wie im Falle der Flavonoid 3'-Hydroxylase (EC. 1.14.13.21) aus *Pelargonium hortorum*. Diese werden nicht weiter berücksichtigt.

```
Ammi       -SCNMETALFLYLIIPCTIILLHQLYHKLRFKLPPGPRPWPIVGNLYDIEPVRFRCFNNW 59
Ocimum     -MAALLLLLLLPLLLP-AIFLLHHLYYRLRFRLPPGPRPLPIVGNLYDVKPVRFRCFADW 58
Pinus      MSVPEMGPFGVVVTGIVAIAIVYKLVQRWRFKLPPGPRPWPVVGNLLQIEPVRFRCFWDW 60
Sesamum    ------MALPLLILSFLTIFIAYKLFQRLRYKLPPGPRPLPVVGNLYDIKPLLVRCFTEW 54
                   : : :    :* : ::*  : *::******* *:**** :::*: .*** :*
                                          PPxPxxxP

Ammi       SKTYGPIISVWFGSTLNVIVNNTELAKEVLKDKDQQLADRHRSRSAAKFSRDGQDLIWAD 119
Ocimum     AQSYGPIISVWFGSTLNVIVSNTELAKEVLKEKDQQLADRHRSRSAAKFSRDGQDLIWAD 118
Pinus      SKKYGPIMSVWFGSTLNVVVSNTELAKEVLKEHDQQLADRPRSRSAEKFSRNGQDLIWAD 120
Sesamum    SQVYGPIFSVYLGSHLSVVVNSAELAKEVLKDNDQQLANRNRTRQIAKFSKNGADLIWSD 114
           :: ****:**::** *.*:*..:********::*****:* *:*.  ***::* ****:*

Ammi       YGPHYVKVRKVCTLELFTPKRLEAIRPVREDEVTAMETVESIYKDCTNSDTIGKSLLVRQ 179
Ocimum     YGPHYVKVRKVCTLELFSPKRLEALRPIREDEVTAM--VESIYHDCTAPDNAGKSLLVKK 176
Pinus      YGPHYVKVRKVCTLELFSPKRLEALRPIREDEVAAM--VESIFNDCGKQEGIGKPLVVKR 178
Sesamum    YGPHYVKVRKLCTLELFSMKRLEGLRPIREDEVTAM--VESIFKDCNKPENKGKALVLRE 172
           **********:******: ****.:**:*****:**  ****::**   :  **.*:::.

Ammi       YLGGVAFNNITRLAFGKRFVNSEGVMETDEQGKEFKSIIANGLKLGASLATAEHIQWLRW 239
Ocimum     YLGAVAFNNITRLAFGKRFVNSEGIIDK--QGLEFKAIVSNGLKLGASLAMAEHIPSLRW 234
Pinus      YLSGVAFNNITRPAFGKRFVNEEGKMDP--QGVEFKEIVATGLKLGASLTMAEHIPYLRW 236
Sesamum    YLGMMAFLHIARLTFGKRFMDSNGVVDG--QGEELKAILHNGIKLGTKKSWAEFLPWFRF 230
           **. :** :*:* :*****::.:* ::   ** *:* *: .*:***:. : **.:  :*:

Ammi       LFPLEEEAFAKHGARRDNLTRAIMETEEHTLARQKSGGTKQHFVDALLTLQSKYDLSEDT 299
Ocimum     MFPLDEDAFAKHGARRDQLTREIME--EHTRAREESGGAKQHFFDALLTLKDKYDLSEDT 292
Pinus      MFPLEEGAFAKHGARRDNVTKAIME--EHTLARQTSG-AKQHFVDALLTLQEKYDLSEDT 293
Sesamum    LFKTENQLLAEHDALADSFTKKIMQ--EHTLARQKTGNTKNHFVDALLTLQKEYDLSDDT 288
           :*  ::  :*:*.*  *..*: **:  *** **: :* :*:**.******:.:****:**

Ammi       IIGLLWDMETITAGADTTAIVVEWGMETAELIKNPRVQEKAQEELDRVIGYERVLTELDF 359
Ocimum     IIGLLWDM--ITAGMDTTAISVEWAMA--ELIKNPRVQQKAQEELDRVIGYERVMTELDF 348
Pinus      IIGLLWDM--ITAGMDTTAITVEWAMA--ELVRNPRIQQKAQEEIDRVVGRDRVMNETDF 349
Sesamum    VIGLLWDM--ISAGMVTTTITVEWAMA--ELVRNPRVQQKVQEELDRVVGSDRVMTEADI 344
           :*******  *:**  **:* ***.*   **::***:*:*.***:***:* :**:.* *:
                        AGxDTT

Ammi       SNLPYLQCVAKEALRLHPPTPLMETLPHRANANVKIGGYDIPKGSNVHVNVWAVARDPAV 419
Ocimum     SNLPYLQCVAKEALRLHPPTPLM--LPHRSNSNVKIGGYDIPKGSNVHVNVWAVARDPAV 406
Pinus      PHLPYLQCITKEALRLHPPTPLM--LPHKATQNVKIGGYDIPKGSNVHVNVWAIARDPAV 407
Sesamum    PNLPYLQCVTKECFRMHPPTPLM--LPHKASTNVKIGGYDIPKGATVSVNVWALARDPAV 402
           .:******::**.:*:*******  ***::. ************:.* *****:******
```

```
Ammi       WKNPLEFRPERFLEEDVDMETKGHDYRLLPFGAGRRVCPEAQLGINLVTSMETLGHLLHH 479
Ocimum     WKNPCEFRPERFLEEDVDMK--GHDFRLLPFGAGRRVCPGAQLGINLVTSM--IGHLLHH 462
Pinus      WKDPVTFRPERFLEEDVDIK--GHDYRLLPFGAGRRICPGAQLGINLVQSM--LGHLLHH 463
Sesamum    WKNPLEFRPERFQEEDIDMK--GTDYRLLPFGSGRRICPGAQLAIYLVTSM--LGHMLHH 458
           **:*  ****** ***:*::  * *:******:***:** ***.* ** **  :**:***
                 FRPERF                 PFGxGRRxCxG

Ammi       YSWAPPSGLSSDEIDMETSESPGMETVTYMETKNTPASCSNTEVAKSVVQTFGSGGHVME 539
Ocimum     FNWAPPSGVSSDELDMG--ENPGLVTYMRTPLEAVPTPRLPSDLYKRIAVDL-------- 512
Pinus      FVWAPPEGMQAEDIDLT--ENPGLVTFMAKPVQAIAIPRLPDHLYKRQPLN--------- 512
Sesamum    FTWTPPAGTKPEDMDMM--EQPGTVTYMRTPLQAVPTPRLPADLFKRVASGNV------- 509
           : *:** * ..::::*:   *.**  *      :  . .    .: *

Ammi       TSSSYVSTPDITLLALYNAFLIIGVCVGVLPLEPGYSFMETLQTMETYVLKAFVSMETKV 599
Ocimum     ------------------------------------------------------------
Pinus      ------------------------------------------------------------
Sesamum    ------------------------------------------------------------

Ammi       TRSTP 604
Ocimum     -----
Pinus      -----
Sesamum    -----
```

Abb. 37: Sequenzvergleiche der C3Hs aus *Ocimum basilicum*, *Pinus taeda* und *Sesamum indicum* mit CYP98A21 aus *Ammi majus*

Sterne (*) kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte (.) bezeichnen den konservierten Austausch von Aminosäuren

*Am*CYP98A21 enthält die zuvor genannten typischen Sequenzmotive für Cyt P450, wobei die letzte Aminosäure (Nr. 459) der Hämbindungsregion [PFGxGRRxCxG] kein Glycin (G), sondern eine Glutaminsäure (E) ist.

3.4.4 *Am*CYP76B8

Die vierte Sequenz, *Am*CYP76B8, hatte eine Länge von 1863 Nukleotiden, wobei der größtmögliche offene Leserahmen bei Nukleotid 256 beginnt und Nukleotid 1744 endet. Somit kodiert dieser für ein Polypeptid von 496 Aminosäuren. Der nicht-kodierende 5'-Bereich von CYP76B8 ist sehr lang, was die Methode des RLM-RACE möglich macht.

```
DNA: GAAAGACAATTGCCATTGTGGCTGTATCAGAAGCTGACATATTACAACTTC

DNA: TTATCACTTTGCATAAGATATCTAAACAATAATGCATAACATGATAGTCCG

DNA: CTGAAGTAATTATAACTGTAGATGACAAGCTGCAAGTTGTAGTTCTGTACA

DNA: ATCAACTATGTACGTCCATTATAAAATATGGGTAGTATGTTGAAATTACTG

                                                Ger5EX AG
DNA: AATCTTCAAAAGAAATCTGATAGAGCTACAAACAAAGTAAGTTTGAGCTAG

     ATGGATGTGATTATCATTG>
DNA: ATGGATGTGATTATCATTGTGTTATCTGTGATGCTTGCTTATGTACTTGTT
 AS: M  D  V  I  I  I  V  L  S  V  M  L  A  Y  V  L  V

DNA: AAGCATCTATTATTATCTCGAGATCGAGGCAAAAATCTTCCCCCAGGCCCA
 AS: K  H  L  L  L  S  R  D  R  G  K  N  L  P  P  G  P

DNA: TTCCAGCTACCTATCATCGGTAACCTTACAAATCTGGGCAAGCTGCCTCAT
 AS: F  Q  L  P  I  I  G  N  L  T  N  L  G  K  L  P  H

DNA: CGGTCCCTAGCCAAACTATCCCAAAACTATGGCCCAATCATGCATCTACAA
 AS: R  S  L  A  K  L  S  Q  N  Y  G  P  I  M  H  L  Q

DNA: CTGGGCCGCGTAACCACCATAGTTATTTCTTCATCAGCCATAGCTCAGCAA
 AS: L  G  R  V  T  T  I  V  I  S  S  S  A  I  A  Q  Q

DNA: GTCTTTCAAAAGAAAGGCCGTGCCTTCTCTAGAAGGTTTATACCGGACTCA
 AS: V  F  Q  K  K  G  R  A  F  S  R  R  F  I  P  D  S

DNA: CTCTGTGCCTGCGACCATTCTCTATACTCTTTTGTATGGTTACCCATCGGC
 AS: L  C  A  C  D  H  S  L  Y  S  F  V  W  L  P  I  G

DNA: CCTCAGTGGAGAAACCTTAGAAAAATAAGCAACTCAAATTTATTTTCAGCT
 AS: P  Q  W  R  N  L  R  K  I  S  N  S  N  L  F  S  A

DNA: AATAAGCTCGACGCAAATCAGCATCTACGTGGTAGGAAGGTGAATGAACTT
 AS: N  K  L  D  A  N  Q  H  L  R  G  R  K  V  N  E  L

DNA: ATTGCATATGTTCAAAAGTGTAGCCAAACTGGAGACGCRXTAGATATTGGT
 AS: I  A  Y  V  Q  K  C  S  Q  T  G  D  A  X  D  I  G

DNA: CGTGCTGCTTTTAGGACTTCCTTCAACCTTTTATCAAACACTGTATTTTCT
 AS: R  A  A  F  R  T  S  F  N  L  L  S  N  T  V  F  S

DNA: AAGGACATGGTAGACCCTTACCAGGATTCAGCTCAGGAGTTCAAGGACTTG
 AS: K  D  M  V  D  P  Y  Q  D  S  A  Q  E  F  K  D  L

DNA: GCATGGAATATTATGGTTGAAGCAGGTTCGCCTAATCTCGTTGATTACTTT
 AS: A  W  N  I  M  V  E  A  G  S  P  N  L  V  D  Y  F

DNA: CCTGTCCTAAAAAAGATGGATCCACAAGGTGTGAAGCGCAGAATGACAGGT
 AS: P  V  L  K  K  M  D  P  Q  G  V  K  R  R  M  T  G

DNA: TACTTTCAGAAAGTAATAAAGATGTTAGATGGTTTAATAAACGAGAGACTG
 AS: Y  F  Q  K  V  I  K  M  L  D  G  L  I  N  E  R  L

DNA: GCTTTGAAGGGGTCAGGCACCACTGTAGATAAGACCGATATGCTTGATGAA
AS:  A  L  K  G  S  G  T  T  V  D  K  T  D  M  L  D  E

DNA: CTGATCAATATCTCTCAAGTGAATCCTAATGAGATGGACAAAATCCTTATG
AS:  L  I  N  I  S  Q  V  N  P  N  E  M  D  K  I  L  M
```

```
DNA: GAACACCTATTTGTGGACATATTTGTTGCTGGAACAGATACAACTTCGAAT
AS:  E  H  L  F  V  D  I  F  V  A  G  T  D  T  T  S  N

DNA: ACAGTGGAATGGGGAATGGCGGAGATACTGAGAAGTACAGAAACCATGATG
AS:  T  V  E  W  G  M  A  E  I  L  R  S  T  E  T  M  M

DNA: AAGGTGAAAGCTGAGCTCCGCCACCTAGTAGGCAAAGGCGTGATATTAGAA
AS:  K  V  K  A  E  L  R  H  L  V  G  K  G  V  I  L  E

DNA: GAGGGGGACATTTATCGATTGCCTTTTTTACAATGTATTGTGAGAGAAACT
AS:  E  G  D  I  Y  R  L  P  F  L  Q  C  I  V  R  E  T

DNA: CTAAGGTTACACCCACCATTTCCTTTATTGTTACCGCGCCAAACAGAAGAG
AS:  L  R  L  H  P  P  F  P  L  L  L  P  R  Q  T  E  E

DNA: GAAACTGAATTAAATGGCTACACTATTCCAAAAAATTCTCAAGTTCTAGTC
AS:  E  T  E  L  N  G  Y  T  I  P  K  N  S  Q  V  L  V

DNA: AATGCCTGGGCAATTGGGCGCGACCCAGTTTCATGGAAAAATCCCTCGTCA
AS:  N  A  W  A  I  G  R  D  P  V  S  W  K  N  P  S  S

DNA: TTTCGCCCAGAAAGATTTTTGGATTCGGAAGTTGATGTAAAAGGCCAGGAC
AS:  F  R  P  E  R  F  L  D  S  E  V  D  V  K  G  Q  D

        P3D59GSP1 CGTTTGGTGCAGGAATAAGG>
DNA: TTCGAGCTGATTCCGTTTGGTGCAGGAATAAGGATATGTCCCGGCTTACCA
AS: F  E  L  I  P  F  G  A  G  I  R  I  C  P  G  L  P

                 <CCACGGTCAATACAACCCAAGG P3D59GSP2
NA: TTGGTAATGAGAATGGTGCCAGTTATGTTGGGTTCCCTCATAAATTGTTTT
AS: L  V  M  R  M  V  P  V  M  L  G  S  L  I  N  C  F

         <CCTTGAACTTCCACCCTAAGG P3D59GSP3
DNA: GATTGGGAACTTGAAGGTGGGATTCCGCTAAATGAATTGGACATGGAGGAG
AS:  D  W  E  L  E  G  G  I  P  L  N  E  L  D  M  E  E

DNA: AAGTGTGGTCTCTCTGTAGCAAAGCTGCACCCACTCCGTGTTTTGGCAACT
AS:  K  C  G  L  S  V  A  K  L  H  P  L  R  V  L  A  T

DNA: TCACAAGTTGTCTAGACTTGAACCATGTTTCTTTTTTCATAATAATAAGCT
AS:  S  Q  V  V

                       <CCAACAACTGCAACACATGCTT Ger3EX
DNA: TAAGATATTGAAGCTTTGTGGGTTGTTGACGTTGTGTACGAAAATGGTGTA

DNA: CTTCAATCTGATTTCAATTTTTCTATCAAAAAAAAAAAAAA
```

Abb. 38: Nukleotidesequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Poylpeptidsequenz von CYP76B8 aus *Ammi majus* L.

Die Datenbankrecherche ergab 55 % Identität und 75 % Ähnlichkeit mit der Geraniol 10-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* (EC 1.14.14.1). Auch die Größe des Polypeptides von *Am*CYP76B8 kommt der Größe der G10H aus *Catharanthus roseus* sehr nahe. Die Ähnlichkeit zu anderen bekannten P450-abhängigen Monooxygenasen liegt unterhalb von 35 % und wird deshalb nicht weiter betrachtet.

```
A.m.    MDVIIIVLSVMLAYVLVKHLLLSRDRGKNLPPGPFQLPIIGNLTNLGKLPHRSLAKLSQN 60
C.r.    MDYLTIIILTLLFALTLYEAFSYLSRRTKNLPPGPSPLPFIGSLHLLGDQPHKSLAKLSKK 60
        ** : *:*::::* .* : :     * *******  **:**.*  **. **:******::
                                   PPxPxxxP

A.m.    YGPIMHLQLGRVTTIVISSSAIAQQVFQKKGRAFSRRFIPDSLCACDHSLYSFVWLPIGP 120
C.r.    HGPIMSLKLGQITTIVISSSTMAKEVLQKQDLAFSSRSVPNALHAHNQFKFSVVWLPVAS 120
        :**** *:**::********::*::*:**:. *** * :*::* * ::  :*.****:..

A.m.    QWRNLRKISNSNLFSANKLDANQHLRGRKVNELIAYVQKCSQTGDAXDIGRAAFRTSFNL 180
C.r.    RWRSLRKVLNSNIFSGNRLDANQHLRTRKVQELIAYCRKNSQSGEAVDVGRAAFRTSLNL 180
        :**.***: ***:**.*:******** ***:***** :* **:*:* *:********:**

A.m.    LSNTVFSKDMVDPYQDSAQEFKDLAWNIMVEAGSPNLVDYFPVLKKMDPQGVKRRMTGYF 240
C.r.    LSNLIFSKDLTDPYSDSAKEFKDLVWNIMVEAGKPNLVDFFPLLEKVDPQGIRHRMTIHF 240
        *** :****:.***.***:*****.********.*****:**:*:*:****:::*** :*

A.m.    QKVIKMLDGLINERLALKGSGTTVDKTDMLDELINISQVNPNEMDKILMEHLFVDIFVAG 300
C.r.    GEVLKLFGGLVNERLEQRRS--KGEKNDVLDVLLTTSQESPEEIDRTHIERMCLDLFVAG 298
         :*:*::.**:****  : *  . :*.*:** *:. ** .*:*:*:  :*:: :*:****
                                                                  AG

A.m.    TDTTSNTVEWGMAEILRSTETMMKVKAELRHLVGKGVILEEGDIYRLPFLQCIVRETLRL 360
C.r.    TDTTSSTLEWAMSEMLKNPDKMKKTQDELAQVIGRGKTIEESDINRLPYLRCVMKETLRI 358
        *****.*:**.*:*:*:..:.* *.: ** :::*:*  :**.** ***:*:*:::****:
        xDTT

A.m.    HPPFPLLLPRQTEEETELNGYTIPKNSQVLVNAWAIGRDPVSWKNPSSFRPERFLDSEVD 420
C.r.    HPPVPFLIPRKVEQSVEVCGYNVPKGSQVLVNAWAIGRDETVWDDALAFKPERFMESELD 418
        ***.*:*:**:.*:..*: **.:**.************* . *.:. :*:****::**:*
                                                   FRPERF

A.m.    VKGQDFELIPFGAGIRICPGLPLVMRMVPVMLGSLINCFDWELEGGIPLNELDMEEKCGL 480
C.r.    IRGRDFELIPFGAGRRICPGLPLALRTVPLMLGSLLNSFNWKLEGGMAPKDLDMEEKFGI 478
        ::*:********** ********.:* **:*****:*.*:*:****:. ::****** *:
                 PFGxGRRxCxG

A.m.    SVAKLHPLRVLATSQVV 497
C.r.    TLQKAHPLRAVPSTL-- 493
        :: * ****.:.::
```

Abb. 39: Vergleich der G10H aus *Catharanthus roseus* (Q8VWZ7, C. r.) mit *Am*CYP76B8 (A. m.)

Sterne (*) kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte (.) bezeichnen den konservierten Austausch von Aminosäuren

Auch bei dieser Sequenz sind die für Cyt P450 typischen Bereiche ohne Besonderheiten zu finden und sind im Sequenzvergleich grau unterlegt.

3.4.5 *Am*CYP82H1

Der vollständige cDNA-Klon von *Am*CYP82H1 hatte 1747 bp. Der größtmögliche offene Leserahmen beginnt bei Nukleotid 5, hat 1590 Nukleotide und kodiert für 530 Aminosäuren. Die vier konservierten Regionen (Prolinreiche Region, Sauerstoffbindungsregion, [-EEFxPERF-]-Motiv, Hämbindungsregion) konnten in der Sequenz wieder gefunden werden.

5.Seq5EX

AAATGATTACGTGTGAAATGG>

```
DNA: GAAAATGATTACGTGTGAAATGGGTATTTACCTTCAAATGCAAGATATCAT
 AS:     M  I  T  C  E  M  G  I  Y  L  Q  M  Q  D  I  I

DNA: ACTGTTTTCCCTTGTATTTTTTTCTACTCTTATTTTATGGAGAATTTTTAG
 AS:  L  F  S  L  V  F  F  S  T  L  I  L  W  R  I  F  S

DNA: TACCTATGTCATAAGAAAGAAGACTTGCTCCGGACCACCAGAACCAGCTGG
 AS:  T  Y  V  I  R  K  K  T  C  S  G  P  P  E  P  A  G

DNA: AAGATGGCCATTAATCGGTCACCTCCATCTTCTTGGAGGAAGCAAGATACT
 AS:  R  W  P  L  I  G  H  L  H  L  L  G  G  S  K  I  L

DNA: GCATCATATACTTGGAGACATGGCTGACGAGTACGGGCCAATCTTCTCTCT
 AS:  H  H  I  L  G  D  M  A  D  E  Y  G  P  I  F  S  L

DNA: GAACCTGGGAATCAACAAAACTGTTGTGATCACTAGTTGGGAAGTTGCGAA
 AS:  N  L  G  I  N  K  T  V  V  I  T  S  W  E  V  A  K

DNA: AGAATGTTTTACAACACAAGACAGGGTTTTTGCCACTCGTCCGAAATCTGT
 AS:  E  C  F  T  T  Q  D  R  V  F  A  T  R  P  K  S  V

DNA: TGTTGGACAAGTAGTAGGATACAACAGTAGAGTCATGATATTTCAGCAATA
 AS:  V  G  Q  V  V  G  Y  N  S  R  V  M  I  F  Q  Q  Y

DNA: TGGAGCATACTGGCGTGAGATGCGTAAGCTTGCAATAATTGAGCTTCTATC
 AS:  G  A  Y  W  R  E  M  R  K  L  A  I  I  E  L  L  S

DNA: CAATCGCAGACTGGATATGCTCAAACATGTCCGGGAATCAGAGGTGAATCT
 AS:  N  R  R  L  D  M  L  K  H  V  R  E  S  E  V  N  L

DNA: TTTCATCAAGGAGCTGTATGAGCAATGGTCAGCCAATGGGAATGGAAGCAA
 AS:  F  I  K  E  L  Y  E  Q  W  S  A  N  G  N  G  S  K

DNA: AGTTGTGGTGGAAATGATGAAAAGGTTTGGAGATCTGACAACAAATATCGT
 AS:  V  V  V  E  M  M  K  R  F  G  D  L  T  T  N  I  V

DNA: GGTCAGGACAGTGGCAGGTAAAAAGTATTCTGGTACTGGTGTACATGGAAA
 AS:  V  R  T  V  A  G  K  K  Y  S  G  T  G  V  H  G  N

DNA: TGAAGAGTCGAGGCAATTTCAGAAGGCCATGGCAGAATTCATGCATTTAGG
 AS:  E  E  S  R  Q  F  Q  K  A  M  A  E  F  M  H  L  G

DNA: GGGGTTGTTAATGGTTTCTGATGCACTCCCCTTACTTGGTTGGATAGATAC
 AS:  G  L  L  M  V  S  D  A  L  P  L  L  G  W  I  D  T

DNA: AGTTAAAGGATGCAAAGGCAAAATGAAGAAGACTGCAGAAGAGATTGATCA
 AS:  V  K  G  C  K  G  K  M  K  K  T  A  E  E  I  D  H

DNA: TATACTTGGAAGCTGTTTAAAGGAGCATCAGCAGAAAAGAACAAATATCAG
 AS:  I  L  G  S  C  L  K  E  H  Q  Q  K  R  T  N  I  S

DNA: CAATAATCATTCGGAGGACGACTTCATTTATGTTATGCTGTCTGCCATGGA
 AS:  N  N  H  S  E  D  D  F  I  Y  V  M  L  S  A  M  D

DNA: CGGGAACCAGTTTCCTGGAATTGACACCGATACTGCCATCAAGGGCACTTG
 AS:  G  N  Q  F  P  G  I  D  T  D  T  A  I  K  G  T  C

DNA: TTTAAGTCTTATCTTAGGTGGTTATGATACGACATCAGCCACACTTATGTG
 AS:  L  S  L  I  L  G  G  Y  D  T  T  S  A  T  L  M  W
```

```
DNA: GGCGCTCTCACTATTACTAAACAACCGTCATGTGTTGAAGAAAGCACAAGA
 AS:  A  L  S  L  L  L  N  N  R  H  V  L  K  K  A  Q  D

DNA: TGAAATGGACCAGTACGTGGGAAGGGATCGCCAGGTAAAGGAATCAGATGT
 AS:  E  M  D  Q  Y  V  G  R  D  R  Q  V  K  E  S  D  V

DNA: GAAGAATTTAACTTATTTGCAAGCCATTGTCAAGGAAACACTGCGATTATA
 AS:  K  N  L  T  Y  L  Q  A  I  V  K  E  T  L  R  L  Y

DNA: TCCAGCAGCACCACTATCAGTCCAGCACAAAGCAATGGCAGATTGCACGGT
 AS:  P  A  A  P  L  S  V  Q  H  K  A  M  A  D  C  T  V

DNA: GGCTGGATTCAACATTCCAGCAGGCACACGGTTAGTTGTGAACCTCTGGAA
 AS:  A  G  F  N  I  P  A  G  T  R  L  V  V  N  L  W  K

DNA: GATGCATCGTGACCCAAAAGTTTGGTCTGATCCTCTAGAGTTTCAACCAGA
 AS:  M  H  R  D  P  K  V  W  S  D  P  L  E  F  Q  P  E

DNA: AAGGTTCCTGCAAAAACATATTAATGTGGACATATGGGGTCAGAATTTTGA
 AS:  R  F  L  Q  K  H  I  N  V  D  I  W  G  Q  N  F  E

                                        <GGACCATAGTGTAAGCG
DNA: GCTCTTACCATTTGGATCAGGACGGAGGTCATGCCCTGGTATCACATTCGC
 AS:  L  L  P  F  G  S  G  R  R  S  C  P  G  I  T  F  A

     CTACG P3D38r GSP3
         < CCAGGAGGTGAACAACTGTGAACG P3D38r GSP2
P3D38rGSP1 GGTCCTCCACTTGACACTTGC>
DNA: GATGCAGGTCCTCCACTTGACACTTGCGCAATTGCTTCATGGGTTTGAACT
 AS:  M  Q  V  L  H  L  T  L  A  Q  L  L  H  G  F  E  L

DNA: GGGAACTGTCTTAGACTCGTCCATTGATATGACTGAAAGTTCAGGTATTAC
 AS:  G  T  V  L  D  S  S  I  D  M  T  E  S  S  G  I  T

DNA: CGACCCAAGAGCAACGCCACTGGAGGTTACTCTGACCCCGCGACTGCCTCC
 AS:  D  P  R  A  T  P  L  E  V  T  L  T  P  R  L  P  P

DNA: TGCAGTCTACCAATAAAACATCACCTTTAGTAGCTTAATCTTCCCTCGGAG
 AS:  A  V  Y  Q

                                        <CCACGTTTATACTAGGA
DNA: ATCCCGAGTTGTACGACTTTTATCTATCAAATAAGGTGCAAATATGATCCT

     AACATAG 5Seq3Ex
DNA: TTGTATCACTTGAAGCAATAATATTTAAATACTAAATGAAGCTCTATAATT

DNA: GAACACTGTTTTA
```

Abb. 40: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz CYP82H1 aus *Ammi majus* L.

Ein Datenbankvergleich und die Einordnung durch Dr. David Nelson (Committee for Standardized Cytochrome P450 Nomenclature), geben nur den Anhaltspunkt, dass es sich bei dieser Sequenz um ein Cyt P450 der Familie CYP82 handelt. Da die Klassifizierung nicht nach der Funktion, sondern rein phylogenetisch erfolgt, hilft dies bei der Funktionsaufklärung nicht weiter. Hier wären weitere Informationen notwendig.

3.5 Northern Blot Analyse

Ein wichtiges Kriterium für eine eventuelle Bedeutung der isolierten Cyt P450 Klone für die Biosynthese der Psoralene ist die Induzierbarkeit der relativen Transkriptmenge durch Elicitorbehandlung. Entsprechend der raschen Produktakkumulation (Hamerski *et al.*, 1990) wäre die Induktion in einem Zeitraum bis zu etwa 6 h bis 8 h zu erwarten. Daher wurde zur Untersuchung der Induzierbarkeit und des zeitlichen Verlaufes der Induktion der isolierten Cyt P450 mit allen Klonen eine Northern Blot Analyse (Dot Blot) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-RNA alle 30 Minuten nach Zugabe des Elicitors über den Zeitraum von 0-6 Stunden (Sequenz 1) und 0-8 Stunden (Sequenz 2-5) von Zellkulturen isoliert. Mit den nicht-induzierten Zellkulturen wurde analog nur mit Wasser statt Elicitor verfahren. Zur semiquantitativen Kontrolle wurde die 25S rRNA quantifiziert (Beladungskontrolle). Sie ist das Maß für die Gesamt-RNA-Menge. Als Sonde diente der jeweilige ORF, der mit [^{32}P]-CTP markiert wurde.

3.5.1 *Am*CYP73A41 (Zimtsäure 4-Hydroxylase)

Obwohl die Northern-Hybridisierung von *Am*CYP73A41 technisch einige Schwierigkeiten bereitete, zeigte sich eine Zunahme um den Faktor von ca. 2,5 in 3,5 h und danach eine Abnahme. Die Tatsache, dass das Bild in den ersten 30 Minuten und nach 4 h von einer üblichen Induktionskurve abweicht, lässt sich eventuell auf die Bedeutung der C4H für mehrere Zweige des Phenylpropanwegs zurückführen.

Die Northern-Blot Analyse von *Am*CYP73A41 hat die Induktion durch pilzlichen Elicitor auf transkriptioneller Ebene bestätigt. Im Vergleich dazu nimmt die Transkriptmenge von *Pisum sativum* CYP73A9 3 Stunden nach Verwundung 4,83-fach zu (Frank *et al.*, 1996). Diese lag-Phase von 1-3 Stunden wurde ebenfalls bei CYP73A1 (Batard *et al.*, 1997) und CYP73A5 (Mizutani *et al.*, 1997) beobachtet.

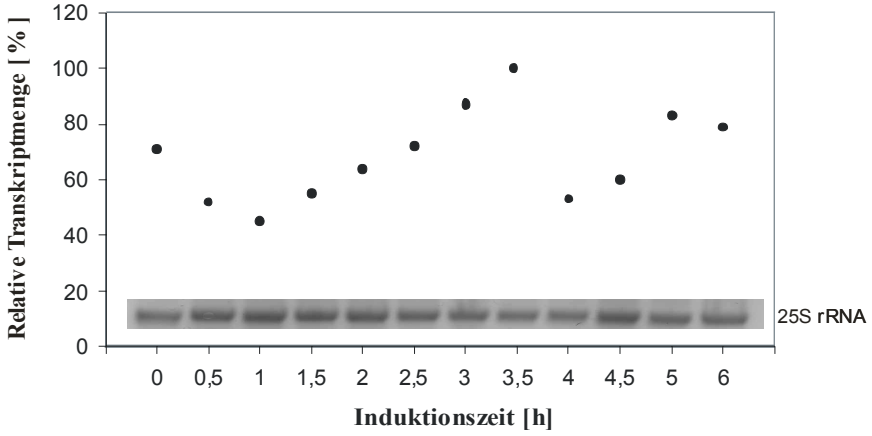


Abb. 41: Relative Transkriptmenge der CYP73A41 nach Elicitor-Induktion von *Ammi majus* Zellen

3.5.2 *Am*CYP71AJ1

Die Transkriptmenge von *Am*CYP71AJ1 wurde durch Elicitor induziert und stieg nach einer lag-Phase von etwa 2 h stetig über den Versuchszeitraum an. Die relative Stärke der Induktion und das zeitliche Muster mit deutlich verzögerter Induktion im Verhältnis zu CYP73A41 kann ein Hinweis auf eine Beteiligung dieses Enzyms an der Psoralensynthese sein.

Die Transkriptmenge stieg am stärksten von allen fünf isolierten Sequenzen. Als Beispiel werden in diesem Fall auch die Originalfilter abgebildet (Abb.40), auf denen in der Kontroll-RNA nur ein äußerst schwaches Signal zu erkennen ist.

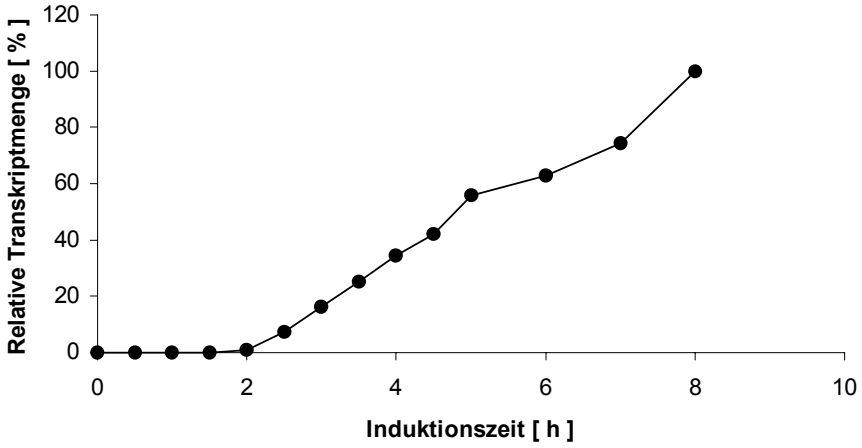


Abb. 42: Induktion der relativen Transkriptmenge von CYP71AJ1 in *Ammi majus* Zellen nach Zugabe von Elicitor

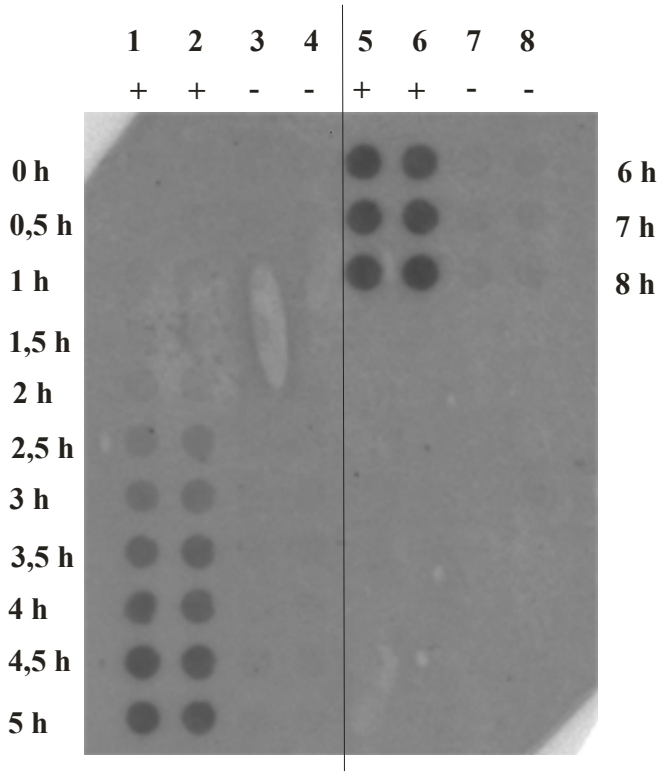


Abb. 43: Northern Dot Blot von *Am*CYP71AJ1
+ induziert; - nicht induziert

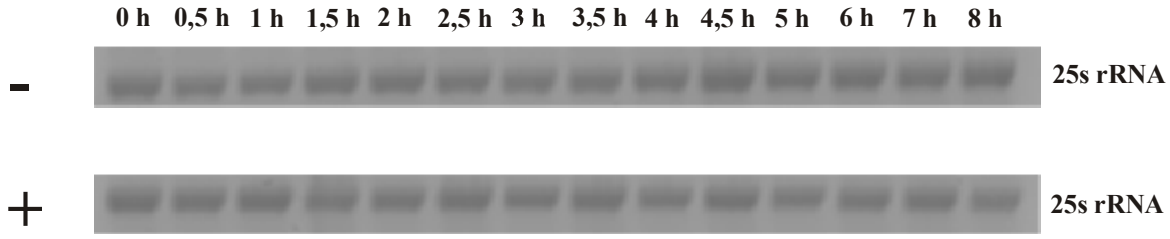


Abb. 44: Relative 25S rRNA Transkriptmenge zur Standardisierung des o.a. Dot Blots
+ induziert, - nicht induziert

Die starke Induktion ist in jedem Falle ein Indiz dafür, dass das Gen CYP71AJ1 an der unspezifischen Abwehrreaktion in *Ammi majus* beteiligt ist. Da Psoralene bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Abwehrreaktion akkumuliert werden (Hamerski *et al*., 1990) und die Induktion von Cytochrom P450-abhängigen Enzymen erfordert, ist es nahe liegend CYP71AJ1 eine Rolle in der Psoralensynthese zuzuschreiben.

3.5.3 *Am*CYP98A21

Auch *Am*CYP98A21 wird auf Transkriptionsebene induziert. Die relative Transkriptmenge steigt etwa 1 h nach Zugabe des Elicitors an und erreicht ein deutliches Maximum nach 3,5 Stunden.

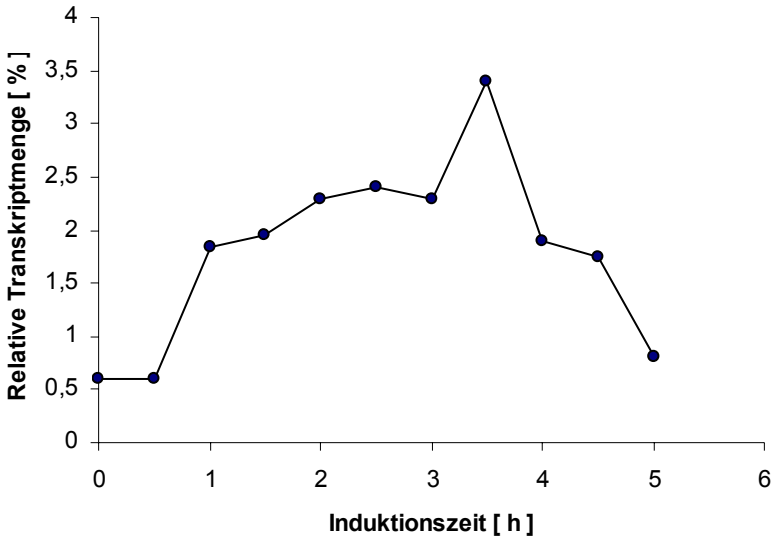


Abb. 45: Relative Transkriptmenge der *Am*CYP98A21 nach Induktion in *Ammi majus* Zellen

Die Sequenzähnlichkeit lässt vermuten, dass es sich hier um eine 4-Cumarat-3-hydroxylase (C3H) bzw. eine 4-Cumaroylester-3-hydroxylase handelt. Für die C3H aus *Arabidopsis thaliana* (CYP98A3) wurde gezeigt, dass sie an der Synthese von Abwehrstoffen wie zum Beispiel den Ligninen, die zu einer Verstärkung der Zellwände führen, beteiligt ist. CYP98A3 wird daher ebenfalls durch Verwundung induziert (Schoch *et al*., 2001), was mit dem Blot von *Am*CYP98A21 übereinstimmt. Das Maxiumum der C4H aus *Ammi majus* bei 3,5 h korreliert ebenfalls.

3.5.4 *Am*CYP76B8

Die Transkriptmenge von *Am*CYP76B8 ändert sich im Zeitraum von 0-8 h nach Elicitorzugabe nicht, was eine Beteiligung an der Psoralenbiosynthese unwahrscheinlich macht. Ebenfalls entspricht dieses Ergebnis nicht dem Verlauf der Transkriptmenge der G10H aus *Catharanthus roseus*. Diese ist mit Methyljasmonat induzierbar und hat nach 8 Stunden ihr Maximum (Collu *et al*, 2001).

3.5.5 *Am*CYP82H1

Auch *Am*CYP82H1 wird auf Transkriptionsebene nicht induziert. Die relative Transkriptmenge von *Am*CYP82H1 ändert sich kaum über 0-8 h nach Zugabe des Elicitors zu *Ammi majus* Zellkulturen. Daher ist dieses Enzym möglicherweise nicht an der Furanocumarinbiosynthese beteiligt.

3.6 Heterologe Expression und Funktionsanalyse der isolierten Klone

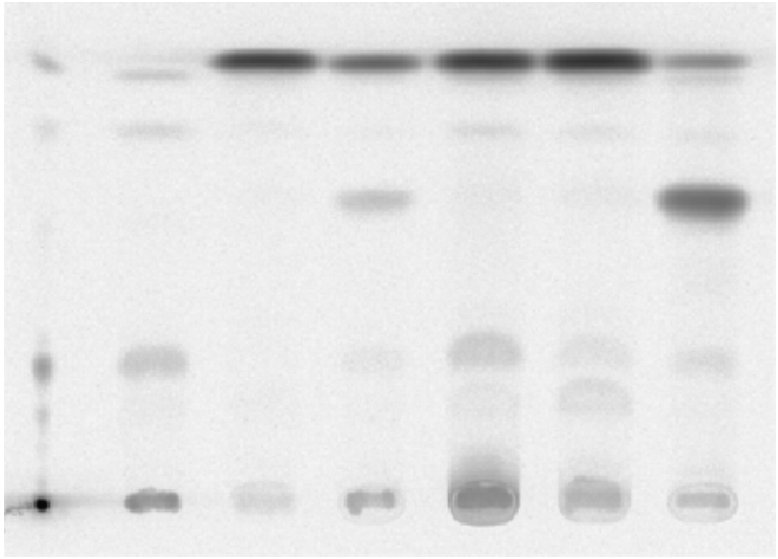
Obwohl die Sequenzähnlichkeiten eine vorläufige Zuordnung der Cyt P450 ermöglichen, erfordert die schlüssige Identifizierung in jedem Fall die Expression und die Charakterisierung des rekombinanten Enzyms. Die Expression wurde in Hefe durchgeführt, da hier bereits eine Hefe-eigene Reduktase vorhanden ist, die für die Aktivität des rekombinanten Enzyms unbedingt benötigt wird, bzw. es sind Hefestämme mit einklonierter *Arabidopsis*-Reduktase erhältlich (P. Urban und D. Pompon, Gif-sur-Yvette, Frankreich).

Dazu wurde der jeweilige ORF in den Hefevektor pYES2.1/V5-His-TOPO® einkloniert und damit der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 transformiert, der über eine endogene Reduktaseaktivität verfügt. Der Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO® eignet sich zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit überhängenden A-Enden, die mit der Taq amplifiziert worden sind. Um Fehler in Laufe der PCR zu vermeiden, wurde die PCR zur Amplifizierung des Expressions-ORF mit einer „proofreading“ Taq mit 3’-5’ Exonuklease-Aktivität durchgeführt, die falsch eingebaute Basen sofort entfernen kann. Zur Kontrolle der korrekten Orientierung wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt, der eine interne Schnittstelle der jeweiligen Sequenz ausnutzt. Da der untranslatierte 5’-Bereich bei der Expression stören kann (Pompon, 1988), wurde dieser nicht mit einkloniert. Die Selektion transformierter *S. cerevisiae*-Zellen erfolgt über den Komplementationsmarker Ade-2. Zur Induktion der Proteinsynthese wurde Galaktose bei einer Dichte von OD_{600} 0,8-1,2 zugegeben. Nach Induktion von 16 Stunden wurden die Hefen geerntet und zur Funktionsanalyse wurden Mikrosomen isoliert.

3.6.1 *Am*CYP73A41(Zimtsäure 4-Hydroxylase)

Das Substrat ^{14}C-Zimtsäure für den Enzymtest wurde zunächst aus ^{14}C-Phenylalanin (Abbildung 46, Spur 1) mittels der PAL aus *Rhodutorula glutinis* (Hefe) hergestellt (Abbildung 46, Spur 3). Die Umsetztung von Phenylalanin erfolgt nicht mit C4H-Mikrosomen (Spur 2). Der Enzymtest mit Substrat, NADPH als Kofaktor und Mikrosomen mit DNA in sense Orientierung lieferte das Produkt ^{14}C-Cumarsäure, das durch Co-

Chromatographie mit Zimtsäure und Cumarsäure nachgewiesen wurde (Spur 7). Im analogen Enzymtest nur ohne NADPH ist etwas Cumarsäure entstanden (Spur 4), was an dem Restgehalt an Kofaktoren in den Mikrosomen liegt. Als Nachweis, dass die Umsetzung nicht durch andere Enzyme der Mikrosomenpräparation erfolgt, wurden zur Kontrolle Mikrosomen aus Hefen isoliert, die mit dem Vektor und CYP73A41 in antisense Orientierung transformiert worden waren. In diesem Test wurde keine Cumarsäure gebildet (Spur 5). Nach Kochen des Enzyms für 15 Minuten bei 95°C und anschließendem Enzymtest entstand ebenfalls keine Cumarsäure (Spur 6), was zeigt, dass die Bildung von ^{14}C-Cumarsäure enzymatisch erfolgt.



	^{14}C-Phenylalanin	PAL	Mikrosomales Protein	NADPH	Produkt
Spur 1	X				
Spur 2	X		X sense	X	
Spur 3	X	X			Zimtsäure
Spur 4	X	X	X sense		Zimtsäure, Cumarsäure
Spur 5	X	X	X antisense	X	Zimtsäure
Spur 6	X	X	X sense, Kochprobe	X	Zimtsäure
Spur 7	X	X	X sense	X	Zimtsäure, Cumarsäure

Rf-Werte

Laufmittel A: *trans*-Zimtsäure Rf 0,55

trans-4-Cumarsäure Rf 0,39

L-Phenylalanin läuft in diesem Laufmittel nicht

Abb. 46: Enzymtest C4H

Nachdem [U^{14}C]Zimtsäure (CEA France, von W. Heller, München erhalten) zur Verfügung stand, wurden die Mikrosomen mit diesem Substrat und NADPH als Kofaktor inkubiert. Hier wurde nur ein radioaktives Produkt nachgewiesen.

In einem dritten gekoppelten Test wurde das Produkt durch die weitere Umsetzung zum radioaktiv markierten Chalcon des Naringenin eindeutig nachgewiesen. Hierbei wurde das radioaktive Produkt in einem gekoppelten Test mit einer rekombinanten 4-Coumarat-CoA-Ligase (Endler *et al*., 2004) und einer rekombinanten Chalconsynthase (CHS) aus *Ruta graveolens* (Springob *et al*., 2000) in der Gegenwart von [2-^{14}C]Malonyl-CoA zum markiertem Naringeninchalcon bzw. Naringenin umgesetzt. Das Chalcon isomerisiert chemisch spontan zu (2R/S)-Naringenin (Springob *et al*., 2000). Der Nachweis erfolgte mittels Co-Cromatographie auf einer Cellulose-Platte in 15 %-iger Essigsäure.

Laufmittel D: Rf Naringenin 0,32

3.6.1.1 Biochemische Charakterisierung der C4H

Zur biochemischen Charakterisierung der rekombinanten C4H in den Hefemikrosomen wurden die pH- und Temperatur-Optima sowie die Michaelis-Menten Konstante (K_m) für *trans*-Zimtsäure und NADPH bestimmt.

3.6.1.1.1 pH-Abhängigkeit

Zur Ermittlung des pH-Optimums wurden sechs verschiedene Puffersysteme (alle 200 mM) zwischen pH 2 und 10 eingesetzt: Glycine-HCl pH 2,0-3,5, Natriumacetat pH 4,0-5,0, Kaliumphosphat pH 5,0-7,5, Bis-Tris-HCl pH 6,0-7,0, Tris-HCl pH 7,0-8,5, Natriumglycinat pH 8,5-10,0. Eine deutliche Aktivität zeigte sich nur zwischen pH 5,5-8,0. Die höchste Aktivität war bei Kaliumphosphat pH 6,5 und Tris-HCl pH 7,0 zu beobachten.

Das pH-Optimum ähnelt den Optima der bereits charakterisierten C4Hs. So hat *Petroselinum crispum* das pH-Optimum bei 7,0 (Koopmann *et al*., 1999) und *Helianthus tuberosus* bei pH 7,4 (Urban *et al*., 1994).

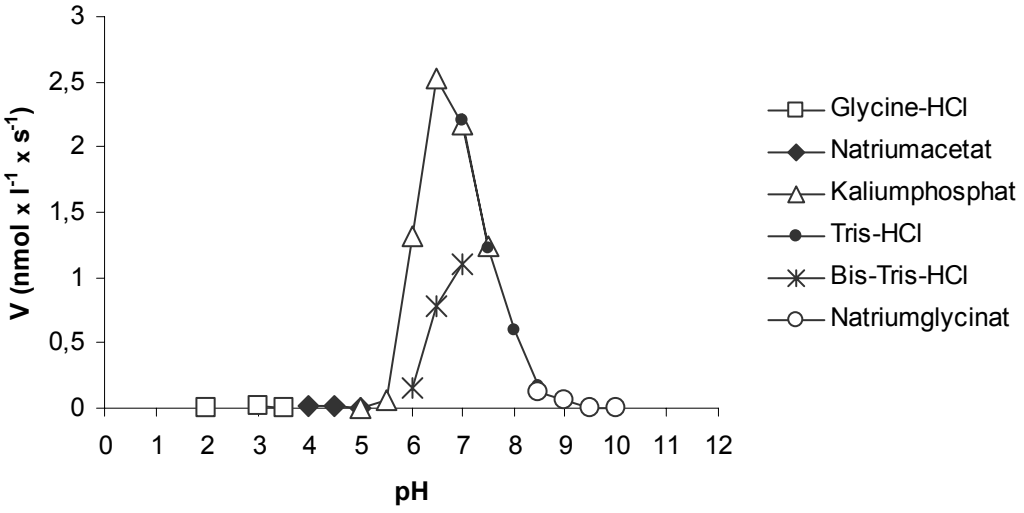


Abb. 47: pH-Abhängigkeit der C4H

3.6.1.1.2 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit der C4H wurde über einen Bereich von 17-45°C in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 bestimmt. Die C4H ist über den gesamten Bereich aktiv, das Optimum liegt bei 25°C. Die Aktivität der C4H aus *Helianthus tuberosus* wurde bei 37°C und die von *Petroselinum crispum* bei 30°C gemessen.

3.6.1.1.3 Kinetische Konstanten der C4H

3.6.1.1.3.1 Protein- und Zeitlinearität

Um die Reproduzierbarkeit der kinetischen Messungen sicher zu stellen, wurden Untersuchungen zur Zeit- und Proteinlinearität durchgeführt.

3.6.1.1.3.1.1 Proteinlinearität

Die Messungen wurden bei 30°C in 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,43 nmol Zimtsäure und 1,2 mM NADPH in einem Gesamtvolumen von 114 µl durchgeführt. Es wurden von 17,1 bis 137 µg mikrosomales Protein aus einer Charge zur Inkubation eingesetzt. Alle Mengen waren im linearen Bereich. In den folgenden Enzymtests wurden 80 µg mikrosomales Protein eingesetzt.

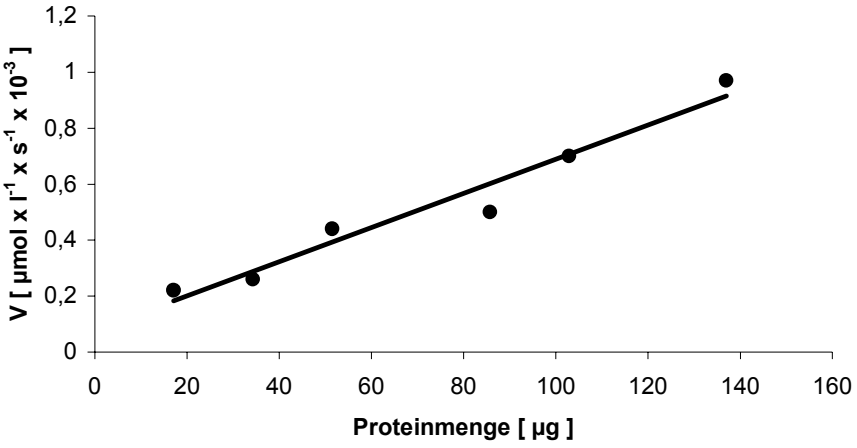


Abb. 48: C4H-Abhängigkeit von der Proteinmenge

3.6.1.1.3.1.2 Zeitlinearität

Unter den Messbedingungen wie zur Bestimmung der Proteinlinearität beschrieben und mit 80 µg mikrosomalen Protein pro Inkubation, wurden die Konzentrationen von Substrat und NADPH in der Sättigung gewählt. Ein linearer Verlauf ist von 10 bis 40 Minuten zu sehen. Alle weiteren Tests wurden über 20 Minuten inkubiert.

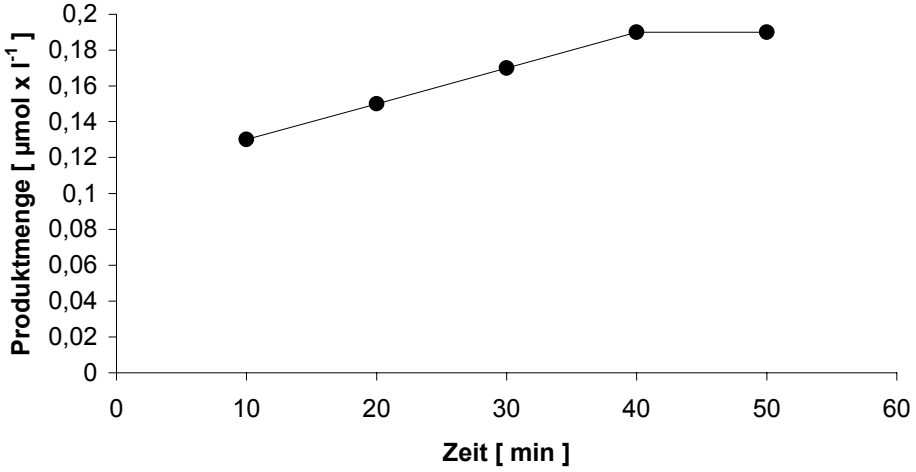


Abb. 49: Abhängigkeit des C4H-Umsatzes von der Zeit

3.6.1.1.3.2 Michaelis-Menten Konstanten

Die Michaelis-Konstante eines Enzyms gibt diejenige Substratkonzentration an, die zu halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit führt und ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Sie ist unabhängig von der Enzymmenge, und die Enzymreaktion wird unter den Bedingungen einer Kinetik pseudo erster Ordnung durchgeführt. Die praktische

Bestimmung von K_m und V_{max} erfolgte nach Lineweaver-Burk. Allerdings ist die V_{max} von der Enzymmenge abhängig, die in der rohen Mikrosomenpräparation nicht einfach bestimmt werden kann.

Die kinetischen Untersuchungen wurden bei 25°C in 200 mM Tris-HCl pH 7,0 und mit 80 µg mikrosomalem Protein pro Inkubation durchgeführt. Zur Bestimmung des apparenten K_m-Wertes für *trans*-Zimtsäure wurde *trans*-Zimtsäure in Konzentrationen von 2,5-20 µM zugesetzt. Die weitere Durchführung entspricht dem Standardenzymtest der C4H. Es wurde eine apparente K_m von 8,9 µM ermittelt. Die maximale Aktivität betrug unter diesen Bedingungen 2,5 pkat/mg mikrosomales Protein.

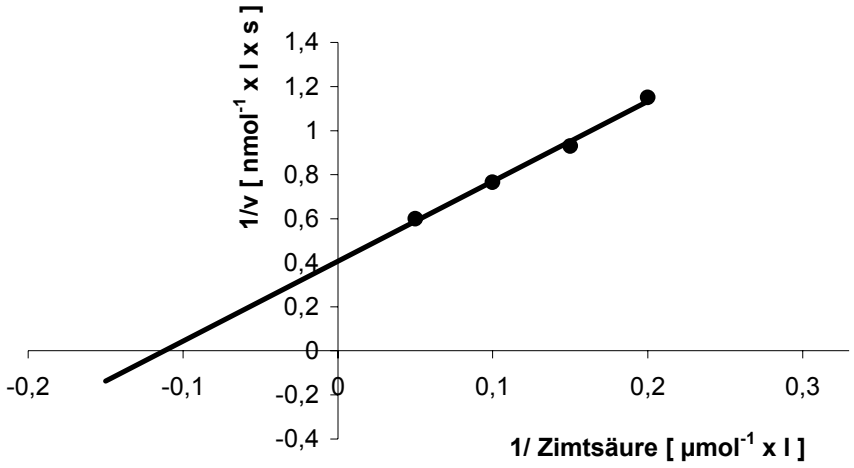


Abb. 50: **Graphische Ableitung der apparenten K_m für Zimtsäure nach doppelt reziproker Auftragung entsprechend Lineweaver-Burk**

Die ermittelte apparente K_m von 8,9 µM, steht im Einklang mit den K_m-Werten andere C4Hs. Zum Beispiel hat CYP73A10 aus *Petroselinum crispum* einen apparenten K_m-Wert von 5 µM (Koopmann *et al.*, 1999) und CYP73A5 aus *Arabidopsis thaliana* (Urban *et al.*, 1997) von 8 µM.

Zur Bestimmung der apparenten K_m von NADPH wurde Zimtsäure (133 µM) mit 4 µM bis 40 µM NADPH und 80 µg mikrosomalen Enzym bei 25°C in 200 mM Tris-HCl pH 7,0 inkubiert. Als Nullwert wurde ein Testansatzt ohne zuegegbenes NADPH gewählt, da in den Mikrosomen auch ohne Zugabe von NADPH durch den Restgehalt an Kofaktoren in den Mikrosomen eine geringe Menge an 4-Cumarsäure gebildet wird. Es wurde eine apparente K_m von 1,6 µM ermittelt.

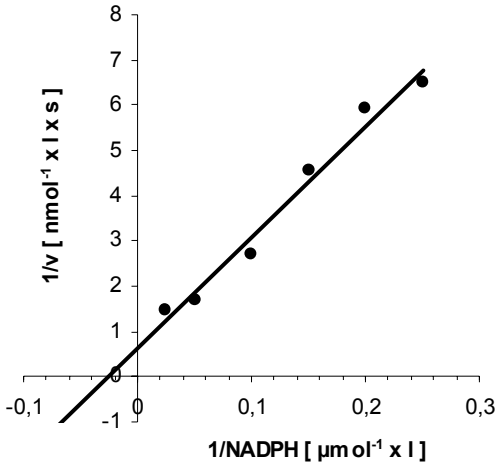


Abb. 51: Graphische Ableitung der apparenten K_m für NADPH nach doppelt reziproker Auftragung entsprechend Lineweaver-Burk

3.6.1.1.4 Untersuchung der Hemmung durch Psoralene

Die C4H ist Teil des generellen Phenylpropanstoffwechsels, und die Aktivität dient entsprechend mehreren spezifischen Phenylpropanwegen, u. a. für die Biosynthese von Cumarinen und Psoralenen. Psoralene sind als „mechanism-based inhibitors“ (MBIs) von Cyt P450 beschrieben (Koenigs und Trager, 1998a, 1998b). Da *Ammi majus* unter Beteiligung der C4H Psoralene bildet, wurde die Wirkung von Psoralenen auf CYP73A41 untersucht.

MBIs werden im katalytischen Zyklus zu einer reaktiven Verbindung, weshalb der Umsatz von NADPH abhängig ist. Die gebildete reaktive Verbindung kann das aktive Zentrum des Enzyms so verändern, dass daraus eine Hemmung resultiert. Aufgrund der Abhängigkeit von NADPH wurden die Ansätze mit und ohne NADPH im Vorinkubat durchgeführt.

Zunächst wurde der Ansatz mit 200 mM Tris-HCl Puffer pH 7,0, 1,2 mM NADPH, 80 µg mikrosomalen Protein in der Gegenwart von 25-100 µM Psoralen bzw. 8-Methoxypsoralen (8-MOP) für 20 Minuten bei 25 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,43 nmol [U^{14}C]Zimtsäure und NADPH und es wurde für 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Bei einer Konzentration von 100 µM Psoralen wurde die Aktivität des Enzyms wie folgt gehemmt: 28 ± 1 % Hemmung in der Gegenwart von NADPH und 29 ± 4 % in Abwesenheit von NADPH. Vorinkubation mit 100 µM 8-Methoxypsoralen (8-MOP) hemmte das Enzym 34 ± 4 % in Anwesenheit von NADPH und 31 ± 2 % in Abwesenheit von

NADPH. Gravot (2002) hat bei der C4H aus *Helianthus tuberosus* (CAP73A1) gezeigt, dass diese in der Gegenwart von NADPH bis zu 85 % durch Psoralene gehemmt wird.

Hemmung der Aktivität [%]

	100 µM		**50 µM**		**25 µM**	
	mit NADPH	**ohne NADPH**	**mit NADPH**	**ohne NADPH**	**mit NADPH**	**ohne NADPH**
Psoralen	28 ± 1	29 ± 4	20 ± 4	23 ± 5	21 ± 1	18 ± 5
8-MOP	34 ± 4	31 ± 2	19 ± 2	5 ± 3	2 ± 2	11 ± 4

Tab. 9: Relative Hemmung der C4H-Aktivität durch Psoralen oder 8-MOP

3.6.2 *Am*CYP71AJ1

Neben der C4H wurde *Am*CYP71AJ1 näher untersucht. Die Sequenzanalyse von *Am*CYP71AJ1 gibt keinen Anhaltspunkt, welche Reaktion das Enzym in *Ammi majus* katalysieren könnte. Da die größte Ähnlichkeit mit der *Mentha* x *piperita* Menthofuransynthase (MFS) besteht, wurde ihr Substrat (+)-Pulegon als Substrat von *Am*CYP71AJ1 in Betracht gezogen. Des Weiteren hat die Northern Analyse den Hinweis ergeben, dass *Am*CYP71AJ1 an der unspezifischen Abwehrreaktion in *Ammi majus* beteiligt ist. Eine denkbare Möglichkeit ist daher eine Beteiligung an der Furanocumarinbiosynthese, zum Beispiel beim Umsatz von Demethylsuberosin zu Marmesin. Aus diesem Grund wurden als weitere Substrate Demethylsuberosin und Marmesin getestet.

Dazu wurde der größtmögliche ORF zunächst in den Hefevektor pYES2.1/V5-His-TOPO® einkloniert und damit der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 transformiert. Nach Isolierung der Mikrosomen wurde das mikrosomale Protein mit (+)-Pulegon in einem nicht radioaktiven Enzymtest entsprechende der Veröffentlichung von Bertea *et al.* (2001) inkubiert. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung konnte kein Produkt identifiziert werden. Daher wurde weiter auf den Umsatz von Demethylsuberosin getestet. 60000 cpm [3-^{14}C]Demethylsuberosin als Substrat wurden in 0,05 M Tris-HCL pH 7,5, 1 mM EDTA, 20 mM NADPH und mikrosomalen Protein bei 20°C und 25°C inkubiert. Auch diese Reaktion zeigte keinen Umsatz. Neben Demethylsuberosin wurde auch [3-^{14}C]Marmesin, das Substrat der Psoralensynthase, getestet, es wurde jedoch kein Umsatz beobachtet. Es stellt sich nun die Frage, ob die Expression funktioniert hat. Die Expression des rekombinanten Enzyms kann nicht überprüft werden, weil die Technik für das CO-Differenzspektrum fehlt

und kein Antikörper vorhanden ist. Die nächste Aufgabe war also die Verbesserung der Expresssion.

Eine Möglichkeit ist, dass für den Enzymtest die Hefe-eigene Reduktase nicht ausreicht und die Reduktase aus einer Pflanze oder sogar aus *Ammi majus* erforderlich ist. Daher wurde der ORF in den Vektor pYeDP60 (Urban *et al*., 1990; Pompon *et al*., 1996) einkloniert. Dazu wurde vor dem Start-ATG eine BamHI-Schnittestelle eingefügt und die interne BamHI-Schnittstelle durch „site-directed mutagenesis“ entfernt. Die EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende wurde durch Herausschneiden aus dem Vektor pCR2.1 erhalten. Der Klon wurde in verschiedene Hefestämme (WR, WAT 11) transformiert. Der Stamm WAT 11 exprimiert die Reduktase ATR1 aus *Arabidopsis thaliana*, der Stamm WR nur die Hefe-eigene. Im Enzymtest mit [3-^{14}C]Demethylsuberosin bzw. [3-^{14}C]Marmesin wurde in keinem der Stämme ein Umsatz beobachtet. Um in Zukunft ein auf *Ammi majus* abgestimmtes Expressionssystem etablieren zu können, wurde zusätzlich die Reduktase aus *Ammi majus* über RT-PCR isoliert (siehe 3.7).

3.6.3 *Am*CYP98A21, *Am*CYP76B8 und *Am*CYP82H1

Bei *Am*CYP98A21 handelt es sich auf Grund der Ähnlichkeit eventuell um eine C3H. Aus *Arabidopsis* haben zwei Arbeitsgruppen etwa gleichzeitig die C3H (CYP98A3) kloniert. Schoch *et al.* (2001) verwendeten dazu einen bioinformatorischen Ansatz, Franke *et al*. (2002a) stützten sich auf Mutanten. Allerdings zeigt die rekombinante CYP98A3 variable Affinitäten zu den Substraten 4-Cumarat, 4-Cumaraldehyd und Estern der 4-Cumarsäure.

Lange war umstritten, ob die 3-Hydroxylierung an der freien Säure, dem CoA-Ester oder anderen Estern erfolgt. Nachdem kürzlich die Klonierung der Acyltransferase aus Tabak gelang (Hoffmann *et al*., 2003), die Shikimat auf p-Cumaroyl-CoA überträgt und von Caffeoyl-CoA wieder abspaltet, findet die Hydroxylierung nach heutigem Erkenntnisstand am *p*-Cumaroyl-Shikimat- oder dem entsprechenden Quinat-Ester statt. Diese Annahme steht im Einklang mit den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen. Franke *et al*. (2002a) beobachteten einen hohen Umsatz von *p*-Cumarsäuremethylester, Schoch *et al*. (2001) von dem Quinat- und Shikimatester der Cumarsäure. Gang *et al*. (2002) erhielten mit CYP98A13 aus *Ocimum basilicum* ebenfalls den höchsten Umsatz mit *p*-Cumaroylshikimat als Substrat. Ein Umsatz der *p*-Cumarsäure wurde nie beobachtet.

Obwohl die freie Cumarsäure wahrscheinlich nicht das Substrat der C3H ist, wurde sie bei CYP98A21 zunächst im Enzymtest eingesetzt. Dazu wurde markierte 4-Cumarsäure aus [U-^{14}C]Zimtsäure durch Inkubation mit rekombinanter *Ammi majus* C4H hergestellt und

dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel mit Laufmittel A gereinigt. Diese Säure wurde in einer nachfolgenden Inkubation mit Mikrosomen aus mit *Am*CYP98A21 transformierter Hefe in 200 mM Tris-HCL pH 7,5 und 1,2 mM NADPH inkubiert. Nach chromatographischer Auftrennung und Analyse mittels Autoradiographie konnte kein Produkt identifiziert werden.

Da CYP98A3 den Cumarsäuremethylester hydroxyliert (Franke *et al*, 2002a) wurde dieser synthetisiert (Synthese durch Edgar Specker) und der Umsatz über HPLC-Analyse getestet. Auch hier wurde kein Umsatz beobachtet.

Um die Frage des Substrates von *Am*CYP98A21 zu klären, wäre wie bei *Am*CYP71AJ1 eine Kontrolle der Expression erforderlich. Zudem müssten der Shikimat- und Quinatester der Cumarsäure als Substrate getestet werden.

Die rekombinanten in Hefe exprimierten Enzyme aus den Sequenzen 3, 4 und 5 wurden alle auf einen Umsatz von [3-^{14}C]Demethylsuberosin und [3-^{14}C]Marmesin getestet. Bei keinem der Enzyme wurde ein neues Produkt beobachtet, doch acuh hier ist die Frage der Expression zu klären.

3.7 NADPH-Cytochrom P450 Reduktase

3.7.1 cDNA-Klonierung

Um in Zukunft ein optimales Expressionssystem für Cyt P450 aus *Ammi majus* etablieren zu können, wurde die CPR aus *Ammi majus* isoliert. Nach Sequenzvergleich der bisher klonierten CPRs aus Pflanzen wurden die degenerierten Primer CPR1 und CPR2 nach Koopmann und Hahlbrock (1997) gewählt, mit denen bereits die Klonierung der CPR1 und CPR2 aus *Petroselinum crispum* gelungen ist. Trotz Anwenden des gleichen PCR-Protokolls konnten keine Banden der entsprechenden Größe amplifiziert werden.

CPR1 5'-GA(GA)CCIACIGA(CT)AA(CT)GCIGC-3'
CPR2 5'-TC(AG)AA(ACT)TCIA(GA)(GA)TG(TGA)(GA)T(GA)CA-3'

Daher wurden aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der C4Hs von *Ammi majus* und *Petroselinum crispum* die nicht degenerierten Primer CPR3.3 (reverse) und CPR5.4 (universe) von zwei Regionen der CPR1 und CPR2 aus *Petroselinum crispum* abgeleitet. Dabei wurden Regionen gewählt, bei denen die beiden Sequenzen weitgehend übereinstimmten. Der Primer CPR5.4 entspricht den Nukleotiden 1037 bis 1058 der CPR1 und den Nukleotiden 1012 bis 1033 der CPR2 aus *Petroselinum crispum*. Der Primer CPR 3.3

entspricht den Nukleotiden 2003 bis 2025 der CPR1 und den Nukleotiden 1978 bis 2000 der CPR2.

CPR3.3	5'-CTGGCCATGCCTTTGGCATCACC-3'
CPR5.4	5'-CTTGCATATGAAACTGGTGACC-3'

In einer PCR mit Standardbedingungen konnte auf Anhieb ein Teilstück der CPR isoliert werden. Anschließend wurden die fehlenden Enden mit 3'-RACE (Primer CPR3RACE) und RLM-RACE (Primer CPR5RACE) amplifiziert.

CPR3RACE	5'-CAATCCAACTTCAAGCTTCCTTCTGATACG-3'
CPR5RACE	5'-CAGTGCACTTCTCACAGTGCATGG-3'
CPR3EX	5'-CAATGGCTGGTGAGAGCTTGGCCACGTCACTACC -3'
CPR5EX	5'-CCTCTACATAACCAAGGTCGGCTGCACTGG-3'

Alle amplifizierten cDNA Klone sind in Abbildung 52 dargestellt.

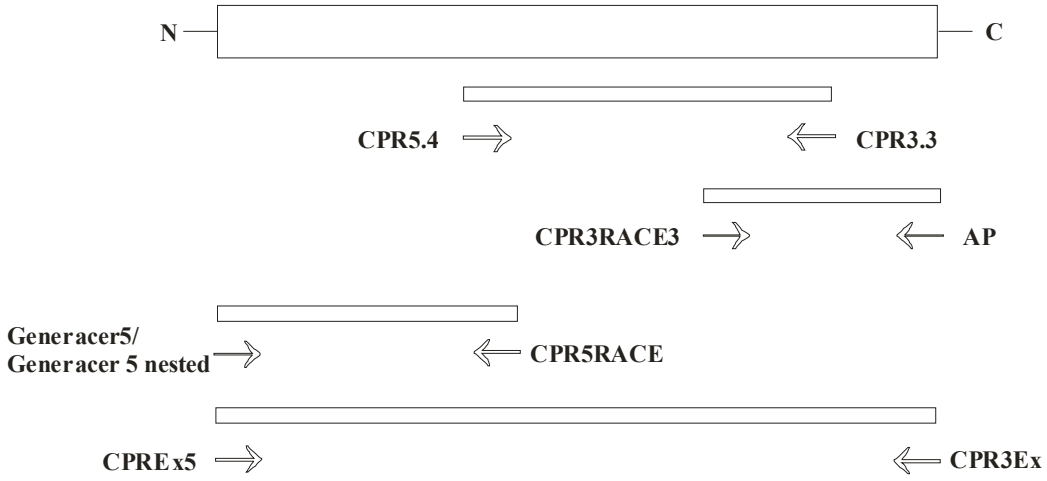


Abb. 52: Amplifizierte Fragmente der CPR aus *Ammi majus*

Der ORF wurde mit der Primerkombination CPR3Ex und CPR5Ex amplifiziert, das PCR-Produkt dann in den Hefevektor pYES2.1/V5-His-TOPO® einkloniert und in *Saccharomyces cerevisiae* (INVSc1) transformiert. Die Expression und Mikrosomenisolierung erfolgte wie bei den fünf Cyt P450.

3.7.2 Sequenzanalyse

Die cDNA der CPR überspannt einen Bereich von 2472 bp. Die nicht-codierende 5'-Region erstreckt sich über 78 bp, es folgt ein 2053 bp langer ORF und ein 351 bp langer nicht-codierende 3'-Bereich. Die cDNA codiert ein Protein mit 681 Aminosäuren.

```
DNA: GAAAACTTATATATTTTTACTCGTACCTCTCTCTCTTTCTCTCTCTCGAAT

                      CPR3Ex >CAATGGCTGGTGAGAGCTTGGCCACG
DNA: AAGTAATTAAAATAAATTTCGATTTCAATGGCTGGTGAGAGCTTGGCCACG
 AS:                            M  A  G  E  S  L  A  T

     TCACTACC
DNA: TCACTACCGGCGACGCTCCTCGAGAATCGTGACCTGTTAATGCTCCTCACC
 AS: S  L  P  A  T  L  L  E  N  R  D  L  L  M  L  L  T

DNA: ACCTCAATCGCCGTTTTGATTGGATGCGCTGTCGTTTTGGTGTGGCGCAGA
 AS: T  S  I  A  V  L  I  G  C  A  V  V  L  V  W  R  R

DNA: TCGAGCCTGCGATCGGTTAAATCAGTTGAGCCGCCGAAGCTGATTGTACCG
 AS: S  S  L  R  S  V  K  S  V  E  P  P  K  L  I  V  P

DNA: AAAGTTGAAATTGAAGATGAAGTTGATGACGGTAAAAAGAAAGTTACCGTG
 AS: K  V  E  I  E  D  E  V  D  D  G  K  K  K  V  T  V

DNA: TTTTTCGGCACTCAAACTGGTACTGCTGAAGGCTTTGCTAAGGCTTTTGCG
 AS: F  F  G  T  Q  T  G  T  A  E  G  F  A  K  A  F  A

DNA: GAGGAGGCGAAAGCGCGGTATGAGAAGGCGAAATTCAGAGTTATTGATTTA
 AS: E  E  A  K  A  R  Y  E  K  A  K  F  R  V  I  D  L

DNA: GATGATTATGCAGCGGAGGATGAGGAGTACGAGGAGAAATTTAAGAAGGAA
 AS: D  D  Y  A  A  E  D  E  E  Y  E  E  K  F  K  K  E

DNA: TCTTTTGCGTTTTTCTTCTTAGCTACATATGGCGACGGTGAGCCAACCGAC
 AS: S  F  A  F  F  F  L  A  T  Y  G  D  G  E  P  T  D

DNA: AATGCGGCGAGATTCTATAAGTGGTTTTCAGAGGGTGAAGAGAAAGGAGAG
 AS: N  A  A  R  F  Y  K  W  F  S  E  G  E  E  K  G  E

DNA: TGGTTAAATAAGCTTCAATATGGAGTGTTTGGTCTTGGAAATAGGCAGTAT
 AS: W  L  N  K  L  Q  Y  G  V  F  G  L  G  N  R  Q  Y

DNA: GAACATTTTAACAAGATCGCGAAAGTTGTTGACGATGGTCTTGCAGATCAG
 AS: E  H  F  N  K  I  A  K  V  V  D  D  G  L  A  D  Q

DNA: GGAGCCAAGCGAATTGTTGAAGTGGGTATGGGAGATGATGATCAATGCATT
 AS: G  A  K  R  I  V  E  V  G  M  G  D  D  D  Q  C  I

DNA: GAAGATGACTTCACCGCATGGCGGGAATCGGTCTGGCCTGAATTGGATAAA
 AS: E  D  D  F  T  A  W  R  E  S  V  W  P  E  L  D  K

DNA: TTGCTTTTGGATGAGGATGACACATCTGCTGCAACTCCTTACACGGCTGCT
 AS: L  L  L  D  E  D  D  T  S  A  A  T  P  Y  T  A  A

DNA: GTTTTGGAATATCGGGTTGTGGTTTATGACCAACCTGATACAGCTACACTG
 AS: V  L  E  Y  R  V  V  V  Y  D  Q  P  D  T  A  T  L
```

```
DNA: GATCAGAGTTTAAGTACCCAAAATGGTCATACAGTCCATGATGCTCAACAT
 AS: D  Q  S  L  S  T  Q  N  G  H  T  V  H  D  A  Q  H

DNA: CCGTGCAGGTCTAACGTAGCTGTAAAGAAAGAGCTTCATAAACCTGCATCT
 AS: P  C  R  S  N  V  A  V  K  K  E  L  H  K  P  A  S

                                                   CTTGCA
DNA: GATCGTTCGTGCATTCACTTGGAGTTCGACATTTCACACACCGGGCTTGCA
 AS: D  R  S  C  I  H  L  E  F  D  I  S  H  T  G  L  A

     TATGAAACTGGTGACC> CPR5.4
DNA: TATGAAACTGGTGACCACGTTGGGGTCTACTGTGAGAATCTGGTTGAAATT
 AS: Y  E  T  G  D  H  V  G  V  Y  C  E  N  L  V  E  I

DNA: GTTGAGGAGGCTGAAAAGCTATTAGGCATGCCACCGAACACTTACTTCTCT
 AS: V  E  E  A  E  K  L  L  G  M  P  P  N  T  Y  F  S

DNA: GTCCATACTGACAACGAAGATGGAACACCACTTACTGGAGGCTCTCTTCCA
 AS: V  H  T  D  N  E  D  G  T  P  L  T  G  G  S  L  P

       CPR5RACE <GGTACGTGACACTCTTCACGTGAC
DNA: CCTCCCTTTCCGCCATGCACTGTGAGAAGTGCACTGGCAAAATATGCAGAT
 AS: P  P  F  P  P  C  T  V  R  S  A  L  A  K  Y  A  D

DNA: CTTTTGAGCTCTCCGAAGAAGTCTGCCTTGCTTGCTCTGGCGGCACATGCT
 AS: L  L  S  S  P  K  K  S  A  L  L  A  L  A  A  H  A

DNA: TCTGATCCTACCGAGGCTGACCGATTAAGATTCTTAGCATCTCCTGCTGGA
 AS: S  D  P  T  E  A  D  R  L  R  F  L  A  S  P  A  G

DNA: AAGGATGAATATGCACAATGGATAGTTGCTAGCCACAGAAGCCTTCTCGAA
 AS: K  D  E  Y  A  Q  W  I  V  A  S  H  R  S  L  L  E

DNA: GTCTTGGCTGAATTTCCATCAGCCAAACCCCCATTGGGGGTATTCTTCGCA
 AS: V  L  A  E  F  P  S  A  K  P  P  L  G  V  F  F  A

DNA: TCAGTTGCACCACGCTTGCAGCCCAGATACTATTCTGTCTCTTCTTCACCA
 AS: S  V  A  P  R  L  Q  P  R  Y  Y  S  V  S  S  S  P

DNA: AGGATGGTACCATCAAGGATTCATGTTACTTGTGCTCTAGTTTATGAGAAA
 AS: R  M  V  P  S  R  I  H  V  T  C  A  L  V  Y  E  K

DNA: ACACCTACGGGGCGAATTCACAAAGGAGTGTGTTCAACTTGGATGAAGAAT
 AS: T  P  T  G  R  I  H  K  G  V  C  S  T  W  M  K  N

DNA: GCTGTTTCTTTGGAGGAAAGCCATGATTGCAGTTGGGCACCCATTTTTGTT
 AS: A  V  S  L  E  E  S  H  D  C  S  W  A  P  I  F  V

             CAATCCAACTTCAAGCTTCCTTCTGATACG> CPR3RACE3
DNA: AGACAATCCAACTTCAAGCTTCCTTCTGATACGAAAGTCCCCATCATTATG
 AS: R  Q  S  N  F  K  L  P  S  D  T  K  V  P  I  I  M

DNA: ATTGGCCCGGGAACTGGATTAGCTCCTTTCAGGGGTTTCCTGCAGGAAAGG
 AS: I  G  P  G  T  G  L  A  P  F  R  G  F  L  Q  E  R

DNA: CAAGCTCTGAAGGATGCTGGAGCAGAGCTGGGGACTGCTGTGTTATACTTT
 AS: Q  A  L  K  D  A  G  A  E  L  G  T  A  V  L  Y  F

DNA: GGGTGCAGAAATAGAAATTTGGATTTTATTTACGAGGATGAGCTAAATAAG
 AS: G  C  R  N  R  N  L  D  F  I  Y  E  D  E  L  N  K

DNA: TTTGTCGAAAGTGGTTCAATCTCTGAGCTAATCGTAGCTTTCTCACGTGAG
 AS: F  V  E  S  G  S  I  S  E  L  I  V  A  F  S  R  E
```

```
DNA: GGGCCCACTAAGGAGTATGTGCAACATAAGATGTTGCAGAAAGCGTCAGAG
 AS: G  P  T  K  E  Y  V  Q  H  K  M  L  Q  K  A  S  E

                                        CPR3.3 <CCACTACGG
DNA: ATCTGGAACTTGATGTCTGAGGGTGCATATATTTATGTCTGCGGTGATGCA
 AS: I  W  N  L  M  S  E  G  A  Y  I  Y  V  C  G  D  A

     TTTCCGTACCGGTC
DNA: AAAGGCATGGCCAGGGATGTCCATCGCATGCTTCACACAATTGCACAGGAG
 AS: K  G  M  A  R  D  V  H  R  M  L  H  T  I  A  Q  E

DNA: CAGGGAGCTCTAGACAGCAGCAAGGCGGAGAGCTGGGTTAAGAACCTTCAA
 AS: Q  G  A  L  D  S  S  K  A  E  S  W  V  K  N  L  Q

                                       CPR3Ex <GGTCACGTCG
DNA: ATGACTGGGAGGTATCTTCGTGATGTATGGTAATTGTTCTTCCAGTGCAGC
 AS: M  T  G  R  Y  L  R  D  V  W

     GCTGGAACCAATACATCTCC
DNA: CGACCTTGGTTATGTAGAGGAGAATATAGTAAATAAGTATACGATGCTATA

DNA: CTTTCCTTAGCCCAGCTCATGAGGGATGAAAAGATATGGGATATACAAGGT

DNA: TATTGTGCTTTTCCTGCAGGCAACCCTGTGGCAGATATTGTTGTCCCAAAT

DNA: CCCTTTATATATTTTTTCTTTTTCATTTGTGGGATTTTATGGTTCAGGCAA

DNA: GTTTTATACAAAATTACGATATTAGGAAAGACCCAGCTGCTCATATCTGTA

DNA: TTATTAGATGATTGTAGAAATTTTGTCGAATAGTATATGAAACAATTTTAT

DNA: GGGATTATCATATTTGTTTTTGCT
```

Abb. 53: Nukleotidsequenz einschließlich der wesentlichen Primer und translatierte Polypeptidsequenz der NADPH-Cytochrome P450 Reduktase (CPR) aus *Ammi majus* L.

Auch hier ist eine auffallend hohe Homologie zu den entsprechenden Sequenzen aus *Petroselinum crispum* zu vermerken. Auf Proteinebene ist sie zu 97 % identisch mit der CPR2 aus *Petroselinum crispum*. Zu den anderen bekannten CPRs aus Pflanzen besteht maximal 72 % Identität.

Wang *et al.* (1997) gelang die Kristallisation der CPR aus Rattenleber, und sie konnten damit die Struktur aufklären. In der Sequenz wurden alle bis heute beschriebenen funktionellen Domänen der CPR wieder gefunden (Abbildung 54). Hierzu zählen die FMN-, FAD-, NADPH-, Cytochrom c- und Cyt P450-Bindungsregionen. Außerdem ist eine hydrophobe Region nahe dem N-Terminus vorhanden, die der Verankerung in der Membran dient.

```
CPR2   --------MGGESLATSLP------------------------ATLLENRDLLM--LLTT 26
Ammi   ------METAGESLATSLP------------------------ATLLENRDLLMETLLTT 30
CPR1   -MQSESMEVSPVDLLASILK----------------IDSVESMTLLLENRDVLM--LLTT 41
C.r.   -MDSSSEKLSPFELMSAILKGAKLDGSNSS--DSGVAVSPAVMAMLLENKELVM--ILTT 55
ATR2   MSSSSSSSTSMIDLMAAIIKGEPVIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAM--IVTT 58
ATR1   -MTSALYASDLFKQLKSIMG-----------------------TDSLSDDVVLV--IATT 34
                    .   ::                          :  :.:  . :  : **

CPR2   SIAVLIGCAVVLVWRRSS--LRSVKSVEPPKLIVPKVEIE-DEVDDGKKKVTVFFGTQTG 83
Ammi   SIAVLIGCAVVLVWRRSS--LRSVKSVEPPKLIVPKVEIE-DEVDDGKKKVTVFFGTQTG 87
CPR1   SFAVLIGLGLVMMWRRSTTMTKSAKKLEPAKIVIPKFEME-EEVDDGKKKVTIFYGTQTG 100
C.r.   SVAVLIGCVVVLIWRRSS--GSGKKVVEPPKLIVPKSVVEPEEIDEGKKKFTIFFGTQTG 113
ATR2   SIAVLIGCIVMLVWRRSG--SGNSKRVEPLKPLVIKPREE--EIDDGRKKVTIFFGTQTG 114
ATR1   SLALVAGFVVLLWKKTTADRSGELKPLMIPKSLMAKDEDDDLDLGSGKTRVSIFFGTQTG 94
       *.*:: *  :::  : :       * :   * :: *   :  ::..*:.:.::*:*****
                                                   FMN-Pyrophosphat

CPR2   TAEGFAKAFAEEAKARYEKAKFRVVDLDDYAAEDEEYEAKFKKESFAFFFLATYGDGEPT 143
Ammi   TAEGFAKAFAEEAKARYEKAKFRVIDLDDYAAEDEEYEEKFKKESFAFFFLATYGDGEPT 147
CPR1   TAEGFAKALAEEAKARYQDAIFKTIDLDDYAGDDDEYETKLKKESMVFFFLATYGDGEPT 160
C.r.   TAEGFAKALAEEAKARYEKAVIKVIDIDDYAADDEEYEEKFRKETLAFFILATYGDGEPT 173
ATR2   TAEGFAKALGEEAKARYEKTRFKIVDLDDYAADDDEYEEKLKKEDVAFFFLATYGDGEPT 174
ATR1   TAEGFAKALSEEIKARYEKAAVKVIDLDDYAADDDQYEEKLKKETLAFFCVATYGDGEPT 154
       ********:.** ****:.: .: :*:****.:*::** *::** ..** :*********
                                 Cyt P450

CPR2   DNAARFYKWFSEGEEKGDWLNKLQYGVFGLGNRQYEHFNKIAKVVDDGLADQGAKRIVEV 203
Ammi   DNAARFYKWFSEGEEKGEWLNKLQYGVFGLGNRQYEHFNKIAKVVDDGLADQGAKRIVEV 207
CPR1   DNAARFYKWFCEGKERGEWLNNLQYGVFGLGNRQYEHFNKIAVVVDDGLVEQGAKRLVPV 220
C.r.   DNAARFYKWFVEGNDRGDWLKNLQYGVFGLGNRQYEHFNKIAKVVDEKVAEQGGKRIVPL 233
ATR2   DNAARFYKWFTEGNDRGEWLKNLKYGVFGLGNRQYEHFNKVAKVVDDILVEQGAQRLVQV 234
ATR1   DNAARFSKWFTEENERDIKLQQLAYGVFALGNRQYEHFNKIGIVLDEELCKKGAKRLIEV 214
       ****** *** * :::.  *::* ****.***********:. *:*: : .:*.:*:: :
                      FMN-Isoalloxazin/Ribose

CPR2   GMG--DDDQCIEDDFTAWRELVWPELDKLLLDEDDTSAATPYTAAVLEYRVVVYDQLDTA 261
Ammi   GMETGDDDQCIEDDFTAWRESVWPELDKLLLDEDDTSAATPYTAAVLEYRVVVYDQPDTA 267
CPR1   GMG--DDDQCIEDDFTAWRELVWPELDQLLLDEESKAAATPYTAAVLEYRVQFYNQTDTS 278
C.r.   VLG--DDDQCIEDDFAAWRENVWPELDNLLRDEDDTTVSTTYTAAIPEYRVVFPDKSDSL 291
ATR2   GLG--DDDQCIEDDFTAWREALWPELDTILREEGDTAVATPYTAAVLEYRVSIHD-SEDA 291
ATR1   GLG--DDDQSIEDDFNAWKESLWSELDKLLKDEDDKSVATPYTAVIPEYRVVTHDPRFTT 272
        :   ****.***** **:* :*.*** :* :* ..:.:*.***.: ****   :
           Cytochrom c

CPR2   T-LDRSLST--QNGHTVHDAQHPCRSSVAAKKELHKPASDRSCIHLEFDISHTGLAYETG 318
Ammi   T-LDQSLST--QNGHTVHDAQHPCRSNVAVKKELHKPASDRSCIHLEFDISHTGLAYETG 324
CPR1   SPLVRSMSK--LNGHAVYDAQHPCRANVAVRRELHTPASDRSCTHLEFDISSTGLAYETG 336
C.r.   ISEANGHANGYANGNTVYDAQHPCRSNVAVRKELHTPASDRSCTHLDFDIAGTGLSYGTG 351
ATR2   KFNDITLAN--GNGYTVFDAQHPYKANVAVKRELHTPESDRSCIHLEFDIAGSGLTMKLG 349
ATR1   Q---KSMESNVANGNTTIDIHHPCRVDVAVQKELHTHESDRSCIHLEFDISRTGITYETG 329
               .   ** :. * :** : .**.::***.  ***** **:***: :*::   *
                                          FAD-Pyrophosphat/Ribose

CPR2   DHVGVYCENLVEIVEEAEKLLGMQ--PNTYFSVHIDDEDGTPLTGGSLPPPFP-PCTVRS 375
Ammi   DHVGVYCENLVEIVEEAEKLLGMETPPNTYFSVHTDNEDGTPLTGGSLPPPFP-PCTVRS 383
CPR1   DHVGVYTENLIEIVEEAERLIDIS--PDTYFSIHTENEDGTPLSGGSLPPPFP-PCSFRT 393
C.r.   DHVGVYCDNLSETVEEAERLLNLP--PETYFSLHADKEDGTPLAGSSLPPPFP-PCTLRT 408
ATR2   DHVGVLCDNLSETVDEALRLLDMS--PDTYFSLHAEKEDGTPIS-SSLPPPFP-PCNLRT 405
ATR1   DHVGVYAENHVEIVEEAGKLLGHS--LDLVFSIHADKEDGSPLE-SAVPPPFPGPCTLGT 386
       *****  :*  * *:** :*:.     :  **:* :.***:*:  .::***** **.. :
```

```
CPR2   ALAKYADLLSSPKKSALLALAAHASDPTEADRLRLLASPAGKDEYAQWVVASHRSLLEVL 435
Ammi   ALAKYADLLSSPKKSALLALAAHASDPTEADRLRFLASPAGKDEYAQWIVASHRSLLEVL 443
CPR1   ALTRYADLLSTPKKSALVALAAHASDPSEAERLRFLASPVGKDEYAQWLVASQRSLLEVL 453
C.r.   ALTRYADLLNTPKKSALLALAAYASDPNEADRLKYLASPAGKDEYAQSLVANQRSLLEVM 468
ATR2   ALTRYACLLSSPKKSALVALAAHASDPTEAERLKHLASPAGKDEYSKWVVESQRSLLEVM 465
ATR1   GLARYADLLNPPRKSALVALAAYATEPSEAEKLKHLTSPDGKDEYSQWIVASQRSLLEVM 446
       .*::** **..*:****:****:*::*.**::*: *:** *****:: :* .:******:

CPR2   AEFPSAKPPLGVFFASVAPRLQPRYYSISSSPRM--VPSRIHVTCALVYEKTPTGRIHKG 493
Ammi   AEFPSAKPPLGVFFASVAPRLQPRYYSVSSSPRMETVPSRIHVTCALVYEKTPTGRIHKG 503
CPR1   AAFPSAKPPLGVFFASVAPRLQPRYYSISSSPRM--APSRIHVTCALVHETTPAGRIHKG 511
C.r.   AEFPSAKPPLGVFFAAIAPRLQPRFYSISSSPRM--APSRIHVTCALVYEKTPGGRIHKG 526
ATR2   AEFPSAKPPLGVFFAGVAPRLQPRFYSISSSPKI--AETRIHVTCALVYEKMPTGRIHKG 523
ATR1   AAFPSAKPPLGVFFAAIAPRLQPRYYSISSCQDW--APSRVHVTSALVYGPTPTGRIHKG 504
       * *************.:*******:**:**.     . :*:***.***:   * ******
                                  FAD-Isoalloxazin

CPR2   VCSTWMK--NAVSLEES-HDCSWAPIFVRQSNFKLPSDTKVPIIM--IGPGTGLAPFRGF 548
Ammi   VCSTWMETKNAVSLEES-HDCSWAPIFVRQSNFKLPSDTKVPIIMETIGPGTGLAPFRGF 562
CPR1   LCSTWMK--NAVSLEDA-HVSSWAPIFVRQSNFRLPTDSKVPIIM--IGPGTGLAPFRGF 566
C.r.   VCSTWMK--NAIPLEES-RDCSWAPIFVRQSNFKLPADPKVPVIM--IGPGTGLAPFRGF 581
ATR2   VCSTWMK--NAVPYEKSEKLFLGRPIFVRQSNFKLPSDSKVPIIM--IGPGTGLAPFRGF 579
ATR1   VCSTWMK--NAVPAEKS-HECSGAPIFIRASNFKLPSNPSTPIVM--VGPGTGLAPFRGF 559
       :*****:  **:. *.: :     ***:* ***:**:...*::*  :************
          NADPH-Pyrophosphat                 NADPH-Ribose/Pyrophosphat

CPR2   LQERQALKDAGAELGTAVLYFGCRNRNLDFIYEDELNKFVESGSISELIVAFSREGPTKE 608
Ammi   LQERQALKDAGAELGTAVLYFGCRNRNLDFIYEDELNKFVESGSISELIVAFSREGPTKE 622
CPR1   MQERLALKESGAELGSAVLYFGCRNRKLDFIYEDELNHFVETGAISEMVVAFSREGPAKE 626
C.r.   LQERLALKEEGAELGTAVFFFGCRNRKMDYIYEDELNHFLEIGALSELLVAFSREGPTKQ 641
ATR2   LQERLALVESGVELGPSVLFFGCRNRRMDFIYEEELQRFVESGALAELSVAFSREGPTKE 639
ATR1   LQERMALKEDGEELGSSLLFFGCRNRQMDFIYEDELNNFVDQGVISELIMAFSREGAQKE 619
       :*** ** : * ***.::::******.:*:***:**:.*:: * ::*: :******. *:
                                                                NADPH-Ribose

CPR2   YVQHKM--LQKASEIWNLIS--EGAYIYVCGDAKGMA--RDVHRM--LHTIAQEQGALDS 660
Ammi   YVQHKMETLQKASEIWNLMETSEGAYIYVCGDAKGMETARDVHRMETLHTIAQEQGALDS 682
CPR1   YVQHKMS--QKASEIWDMIS--HGAYIYVCGDAKGMA--RDVHRM--LHTIAQEQGALDS 678
C.r.   YVQHKMA--EKASDIWRMIS--DGAYVYVCGDAKGMA--RDVHRT--LHTIAQEQGSMDS 693
ATR2   YVQHKMM--DKASDIWNMIS--QGAYLYVCGDAKGMA--RDVHRS--LHTIAQEQGSMDS 691
ATR1   YVQHKMM--EKAAQVWDLIK--EEGYLYVCGDAKGMA--RDVHRT--LHTIVQEQEGVSS 671
       ******   :**:::* ::.  . .*:*********   *****   ****.*** .:.*
                                NADPH-Nicotinamid

CPR2   SKAESWVKNLQMT--GRYLRDVW 681
Ammi   SKAESWVKNLQMETTGRYLRDVW 705
CPR1   SHAESLVKNLHMS--GRYLRDVW 699
C.r.   TQAEGFVKNLQMT--GRYLRDVW 714
ATR2   TKAEGFVKNLQTS--GRYLRDVW 712
ATR1   SEAEAIVKKLQTE--GRYLRDVW 692
       :.**. **:*:    ********
```

Abb. 54: Sequenzvergleich der NADPH cytochrome P450 Reduktasen

Zeile 1: CPR2 aus *Petrsoelinum crispum*
Zeile 2: CPR aus *Ammi majus*
Zeile 3: CPR1 aus *Petroselinum crsipum*
Zeile 4: CPR aus *Catharanthus roseus*
Zeile 5: ATR2 aus *Arabidopsis thaliana*
Zeile 6: ATR1 aus *Arabidopsis thaliana*
Sterne (*) kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte (.) bezeichnen den konservierten Austausch von Aminosäuren

3.7.3 Expression und Funktionsanalyse

Der ORF der CPR wurde in den Hefevektor pYES2.1/V5-His-TOPO® ligiert und damit der Stamm INVSc1 transformiert. Die Induktion und Mikrosomenisolierung erfolgten analog zur Expression der Cyt P450 aus *Ammi majus*.

Die Aktivität der Reduktase aus *Ammi majus* wurde über die Reduktion von Cytochrom C bestimmt. Die Messung erfolgte im Vergleich zu einem Kontrollansatz, der nur die Hefe-eigene Reduktase enthielt. Es zeigte sich, dass der Messanasatz mit der exprimierten Reduktase aus *Ammi majus* um den Faktor 4,4 aktiver ist als der Ansatz mit der Hefe-eigenen Reduktase.

4. Diskussion

Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen kommen ubiquitär in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren vor und katalysieren sehr unterschiedliche Reaktionen. Während z. B. die Leber solche Enzyme mit breiter Substratspezifität exprimiert, scheinen die pflanzlichen Enzyme sehr spezifisch zu sein. In Pflanzen katalysieren sie z. B. Schritte in der Biosynthese von Hormonen (Auxine, Gibbereline) oder auch den linearen Furanocumarinen (Psoralene). Besonders die Familien der Apiaceae und Rutaceae bilden Furanocumarine, die ihnen als Abwehrstoffe dienen. Kurioserweise haben sich im Laufe der Evolution bestimmte Insekten angepasst, die die Furanocumarine entgiften können und durch Fressen die Pflanzen schädigen (Berenbaum, 2002).

Der spezielle Biosyntheseweg der Psoralene ist aus Vorstufenexperimenten bekannt. Er beginnt mit dem generellen Phenylpropanweg, in dem L-Phenylalanin zu Zimtsäure (PAL) und 4-Cumarsäure bzw. 4-Cumaroyl-CoA umgesetzt wird. Es ist noch unklar, ob die 4-Cumarsäure oder das 4-Cumaroyl-CoA das Substrat für den nächsten Schritt darstellt. Formal soll es sich um eine *ortho*-Hydroxylierung des Aromaten handeln, der die Cyclisierung zum Benz-2-pyron folgt (Gestetner und Conn, 1974). Die Hydroxylierung ist nur indirekt mechanistisch untersucht und ein „NIH-Shift“ nachgewiesen worden (Ellis und Amrhein, 1971). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass ein Cyt P450 beteiligt ist. Anschließend setzen eine Prenyltransferase und zwei Cyt P450 (Marmesinsynthase, Psoralensynthase) das Umbelliferon zum Psoralen um. Die weiteren Hydroxylierungen werden ebenfalls durch Cyt P450 katalysiert. Obwohl bis heute durch moderne molekularbiologische Methoden eine Vielzahl von pflanzlichen Cyt P450 isoliert werden konnten, ist noch keine Cyt P450 Sequenz dieser Biosynthese bekannt.

4.1 Strategien zum Klonieren von Cyt P450 aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanze

Es gibt verschiedene biochemische und molekularbiologische Strategien zur Isolierung von Cyt P450 aus Pflanzen. Eine klassische Proteinreinigung wie im Falle von löslichen Enzymen ist bei Cyt P450 schwierig, weil die Cyt P450 membrangebunden sind und oft nur in geringen Mengen exprimiert werden (Bolwell *et al.*, 1994). Man muss außerdem davon ausgehen, dass immer mehrere (sehr ähnliche) Cyt P450 vorliegen, die kaum zu trennen sind. Nur wenige pflanzliche Cyt P450 sind bisher gereinigt worden, so zum Beispiel die G10H (Meier *et al.*, 1993), die C4H (Teutsch *et al.*, 1993) und die Obtusifoliol 14α-Demethylase (Kahn *et al.*,

1996). Bahnbrechend war die Klonierung der C4H aus *Helianthus tuberosus* (Teutsch *et al.*, 1993) die zur Konstruktion von Primern für die RT-PCR führte. Zwar besitzen einige Cyt P450 weniger als 20 % Sequenzidentität, es sind jedoch in allen pflanzlichen Cyt P450 mehrere konservierte Bereiche vorhanden, die man bei der PCR ausnutzen kann. Nach dem hydrophoben Bereich am N-Terminus folgt die prolinreiche Region mit der Konsensussequenz [(P/I)PGPx(G/P)xP]. Die Sauerstoffbindungsregion mit der Konsensussequenz [(A/G)Gx(D/E)T(T/S)] befindet sich ungefähr 60 % vom C-Terminus entfernt. Es folgen zwei weitere konservierte Motive mit den Konsensussequenzen [KETLR] und [PERF], deren Funktion noch nicht genau bekannt ist. Am höchsten konserviert ist die Hämbindungsregion [PFGxGRRxCxG]. Das Cystein dieses Motivs dient als fünfter Ligand für das Häm-Eisen. Bei herkömmlichen RT-PCR-Methoden besteht das Problem, dass immer mehrere Cyt P450 exprimiert werden und die Transkripte in der RNA-Population nicht unterschieden werden können. Allerdings lässt sich in induzierbaren Systemen die Suche verfeinern, indem die Amplifikation differentiell durchgeführt wird. Die Induzierbarkeit der Furanocumarinbiosynthese durch pilzlichen Elicitor ist ein solches Beispiel. Methoden wie die differentielle Hybridisierung von Genbanken (Vetter *et al.*, 1992), das RDA (Representational Difference Analysis) oder die substraktive Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen sind beschrieben. Bei der differentiellen Hybridisierung von Genbanken wird eine cDNA-Phagenbank, die die gesamte mRNA repräsentiert, mit cDNA-Sonden aus zwei Zellpopulationen hybridisiert. Der Vorteil ist, dass eine solche Phagenbank die gesamte Information der mRNA einer Zelle repräsentiert. Ein Nachteil ist aber, dass der differentielle Aspekt nur durch unterschiedlich stark hybridisierte Phagenplaques kenntlich wird, was zu Ungenauigkeiten führen kann. Das RDA ist eine auf PCR basierende substraktive Hybridisierung. Hierbei wird die DNA von zwei unterschiedlichen Genomen oder auch cDNA von induzierten und nicht-induzierten Zellen getrennt extrahiert, mit Restriktionsenzymen verdaut und in einer PCR amplifiziert. Nach Ligation von Adaptern an die Fraktion, die das differentielle Gen enthält, werden die beiden Fraktionen vereinigt. Die sich entsprechenden Fragmente der beiden Fraktionen hybridisieren miteinander. In einer anschließenden PCR wird der Adapter zur Amplifizierung ausgenutzt, wodurch nur die differentiellen mit sich selbst hybridisierten Sequenzen exponentiell zunehmen, die beide den Adapter beinhalten. Die substraktive Hybridisierung beruht darauf, dass sich die komplementären Nukleinsäuren aus zwei differentiellen Populationen paaren und zum Beispiel über Hydroxylapatit-Chromatographie abgetrennt werden können. Hierbei

binden einzelsträngige Nucleinsäuren weniger stark an das Mineral als doppelsträngige, so dass Hybride aus dem Ansatz entfernt werden könen.

Die Differential Display RT-PCR (DD-RT-PCR) von RNA wurde bereits zur Amplifizierung von Cyt P450 optimiert (Schopfer und Ebel, 1998). Der Erfolg der DD-RT-PCR beruht auf der Verwendung von RNA aus induzierten und nicht-induzierten Zellen und liefert unterschiedlich amplifizierte Fragmente, die in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Schopfer und Ebel haben diese Methode durch Einsatz der Cyt P450-spezifischen Decamer-Primer verbessert. Die Decamer-Primer binden an das hochkonservierte PFG-Motiv und decken dabei alle möglichen Codes ab, und im Vergleich zu willkürlichen Primern lässt sich eine Reduktion von falsch positiven Banden erzielen. Die Verwendung dieser 24 Primerkombinationen führt zur Erfassung von vielen Cyt P450 einer Pflanze. Zudem ermöglicht diese Methode die gezielte Isolierung von differentiell regulierten Cyt P450 aus einem nicht differentiellen Hintergrund. Durch die spezifischen, nicht degenerierten Primer in getrennten PCR-Ansätzen sind nach der folgenden Größenauftrennung auf Polyacrylamid einzelne distinkte Banden zu sehen, die separat analysiert werden können. Eine Bande enthält idealerweise nur ein Cyt P450-Fragment. Ein Nachteil der DD-RT-PCR ist die Kürze der Primer von 8 Nukleotiden. Dies kann zu einer unzureichenden Bindung und Amplifizierung führen. Mit der Cyt P450-spezifischen DD-RT-PCR gelang bereits die Klonierung der Dihydroxypterocarpan 6-hydroxylase aus *Glycine max* (Schopfer und Ebel, 1998), der Flavon Synthase II aus *Gerbera* Hybriden (Martens *et al*., 1999) und der Tabersonin 16-hydroxylase aus *Catharanthus roseus* (Schröder *et al.*, 1999). Eine weitere Methode, bei der ebenfalls die Decamer-Primer eingesetzt werden, ist die PCR nach Fischer *et al*. (2001). Sie zielt nicht wie das Differential Display auf die Klonierung von differentiellen Cyt P450, sondern auf die Amplifizierung von möglichst vielen Cyt P450.

Durch Anwendung weiterer spezieller molekularbiologischer Methoden konnten nach längerer Forschung auch die lange gesuchten Cyt P450 Sequenzen der C3H und der F5H des Phenylpropanwegs aufgeklärt werden. Mittels Bioinformatik (Schoch *et al*., 2001) und Arbeiten mit Mutanten (Franke *et al*., 2002a) wurde die C3H (CYP98A3) kloniert und durch T-DNA tagging die Ferulat 5-Hydroxylase (F5H, CYP 84A1; Meyer *et a*l., 1996).

4.2 Klonierung von Cyt P450 aus *Ammi majus* L.

Da die klassische Enzymreinigung bei membrangebundenen Enzymen schwierig ist, wurde der direkte Zugang über die Klonierung von induzierbaren Cyt P450 gewählt. Bei der Suche nach den Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese, die vermutlich die *ortho*-Hydroxylierung

zum Cumarin und sicher die Bildung des Marmesins, Psoralens und Bergaptols katalysieren, kann man sich nur die hoch konservierten Regionen zu Nutze machen, da es für die Enzyme noch keine Präzedenzen gibt. Dieser Ansatz setzt also voraus, dass die Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese die konservierten Motive enthalten.

Bei allen RT-PCR-Strategien wurde RNA aus *Pmg*-induzierten Zellen als Ausgangsmaterial eingesetzt, da die Induzierbarkeit der Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von konstitutiv exprimierten Cyt P450 ist. Wahrscheinlich werden die Cytochrome der Psoralenbiosynthese auf Transkriptionsebene induziert zu, wie es bei der Bergaptol O-Methyltransferase der Fall ist (Hehmann *et al*., 2003). Der Beweis dazu steht jedoch noch aus.

Methodisch wurde das Differential Display mit den Cyt P450 spezifischen Primern nach Schopfer und Ebel (1998) gewählt. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass es sich auf Cyt P450, die unter definierten Bedingungen induziert werden, beschränkt. Allerdings ist die Induktion mit *Pmg* nicht auf die Furanocumarinbiosynthese beschränkt, wahrscheinlich steigt auch die Transkriptmenge weiterer anderer Cyt P450 an. So ist nur eine Amplifizierung von vielen ESTs induzierter Cyt P450 möglich. Um differentielle Banden zu erhalten, müsste sichergestellt werden, dass im nicht induzierten Ansatz das gesuchte Cyt P450 nicht vervielfältigt wird. Da nicht auszuschließen ist, dass die Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese auch zu einem geringen Teil in den nicht induzierten Zellen exprimiert werden, wäre es effektiver, im Vergleich mit einer Zelllinie zu arbeiten, die keine Furanocumarine mehr bilden kann. Eine solche Zelllinie kann aufgrund der fehlenden Daten zur Furanocumarinbiosynthese zum jetzigen Zeitpunkt nur durch zufällige Mutation entstehen und nicht durch Genetic Engineering hergestellt werden.

Parallel zur DD-RT-PCR wurde eine modifizierte Version der PCR nach Fischer *et al.* (2001) angewendet, mit der die Klonierung von 6 ESTs gelang. Bei dieser Methode werden Oligonukleotide eingesetzt, die von zwei Konsensusregionen der Cyt P450 ([PERF]-Motiv und [PFGxGRRx**C**xG]-Motiv) abgeleitet worden sind. Im Vergleich zur DD-RT-PCR werden bei diesem Verfahren nicht nur induzierte Cyt P450 amplifiziert, und jede Bande enthält nicht nur ein dominierendes Fragment. Dafür ist eine Amplifizierung von möglichst vielen Cyt P450 möglich und alle klonierten Banden führten zu Cyt P450. Es gibt also im Unterschied zur DD-RT-PCR keine falsch positiven Banden.

Nach Isolierung der 6 ESTs folgte die Generierung der vollständigen ORFs mittels RACE-Techniken. Das 3'-RACE ist schnell und effizient, wohingegen das 5'-RACE von Cyt P450 durch die prolinreiche Region nahe dem 5'-Ende herausfordernd ist. Die Codons für

Prolin (CCx) der prolinreichen Region enthalten alle mindestens zwei Cysteine. Beim 5'-RACE mit C-Tailing werden dCTP an das 5'-Ende angefügt. Die Primer der PCR können daher eine falsche Bindung bei der prolinreichen Region eingehen, so dass die Isolierung des gesamten 5'-Bereiches nicht erfolgreich ist, wie es auch bei den isolierten ESTs aus *Ammi majus* der Fall war. Da alle verschiedenen RACE-Methoden mit der gleichen RNA durchgeführt wurden, konnte die RNA als Ursache des Scheiterns beim Tailing ausgeschlossen werden. Daher wurde das RLM-RACE (RNA Ligase-Mediated Rapid Amplification of cDNA ends) angewendet, bei dem nur intakte mRNA zu cDNA transkribiert wird. Diese Methode führte dann bei allen sechs Fragmenten zur vollständigen Amplifizierung in 5'-Richtung. Nach Erhalt der vollständigen Sequenzen zeigte sich, dass zwei ESTs zu der gleichen Sequenz (*Am*CYP71AJ1) führten.

4.3 Expression in Hefe und Klonierung der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase

Die Klone mit vollständigen ORFs wurden zur Expression eingesetzt, um nach Möglichkeit die biochemische Funktion aufzuklären. Es stehen zur Expression von eukaryotischen Cyt P450 vier verschiedene Systeme zur Verfügung, nämlich *E. coli*, Insektenzellen, Säugerzellen und Hefe. Eine heterologe Expression von eukaryotischen Cyt P450 beinhaltet grundsätzlich mehrere Probleme. Zum einen sind sie mit der Membran assoziiert, außerdem erfordert aktives Protein die Bildung von nicht kovalent gebundenem Häm, das dann in das Polypeptid eingefügt werden muss. Des Weiteren ist bei Cyt P450 grundsätzlich der Elektronentransfer durch eine NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) erforderlich. Die CPR ist ein integrales Membranprotein und transportiert als Flavoprotein die notwendigen Elektronen von NADPH über FAD und FMN zum Cyt P450. Da *E. coli* über keine eigene Reduktase verfügt, haben unter anderem Hotze *et al.* (1995) für die Expression in *E. coli* P450/P450-Reduktase Fusionen einer Pflanze hergestellt. Bak *et al.* (1998) haben nach Isolierung von Membranen der transformierten *E. coli* im Enzymtest zusätzlich die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase derselben Pflanze zugefügt. In manchen Fällen kann eine Expression mit dem *Spodoptera frugiperda* Baculovirus System erforderlich sein. Jennewein *et al.* (2001) konnten erst nach Expression mit diesem System die Taxan 13α-Hydroxylase aus *Taxus brevifolia* funktionell exprimieren. Diese Expression führt zu einer Expression mit der gleichen Stärke wie Hefe oder *E. coli* und zur Bildung von Proteinen mit spezifischer Aktivität wie in Säugerzellen (Lee *et al.*, 1996). Am gebräuchlichsten ist die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*, der Bäckerhefe (Urban *et al.*, 1994). Dieses System eignet sich besonders, da die Reduktase aus Hefe oder aus anderen Organismen die Elektronen liefert. Pompon *et al.* (1996) haben zwei

Hefestämme generiert, die über die ATR1 bzw. ATR2 aus *Arabidopsis thaliana* verfügen. Durch die Koexpression der Reduktase aus *Arabidopsis* wurde der Funktionsnachweis pflanzlicher Cyt P450 ermöglicht, denn bei manchen Enzymen besteht die Möglichkeit, dass die endogene Reduktase (CPR) aus Hefen für eine messbare Enzymaktivität nicht ausreicht (Truan *et al.*, 1993).

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der heterologen Expression, ist ein Austausch der Codons im N-terminalen Bereich via PCR. In manchen Fällen verursacht die unterschideliche „codon usage“ in den verschiedenen Organismen Probleme bei der heterologen Expression (Batard *et al.*, 2000; Perlak *et al.*, 1991; Rouwendal *et al.*, 1997). Pflanzen verwenden im Vergleich zu Hefen und Insekten Codons mit deutlich höherem GC-Gehalt. Die folgende Tabelle vergleicht die ersten Codons von *Am*CYP71AJ1, einem der isolierten Cyt P450 aus *Ammi majus*, mit den entsprechenden am häufigsten vorkommenden Codons in Hefe. Es wird deutlich, dass die Codons der Aminosäuren K, L, Q, P, Y und S nicht mit den für Hefe typischen Codons übereinstimmen und eventuell ausgetaucht werden müssten.

AS	M	**K**	M	**L**	E	**Q**	N	**P**	**Q**	**Y**	L	Y	F	**S**	L
CYP71AJ1	ATG	AAG	ATG	CTG	GAA	CAG	AAT	CCC	CAG	TAC	CTG	TAT	TTT	TCA	CTT
Hefe	ATG	AAA	ATG	CTA	GAA	CAA	AAT	CCA	CAA	TAT	CTG	TAT	TTT	TCT	CTT

Tab. 10: Vergleich der Codons von *Ammi majus* und Hefe

In der Tabelle sind die Codons der ersten 15 Aminosäuren (AS) von *Am*CYP71AJ1 und die entsprechenden Codons in Hefe angegeben. Unterschiedliche Basen sind grau unterlegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Expression in Hefe zwei verschiedene Vektoren eingesetzt, wobei der Stamm INVSc1 (Invitrogen) mit pYES2.1/V5-His-TOPO transformiert wurde, der nur die Hefe-eigene Reduktase enthält. Das Reduktionspotential der CPR kann im nachfolgenden Enzymtest eventuell nicht ausreichen.

Um in Zukunft ein auf *Ammi majus* abgestimmtes Expressionssystem zu etablieren, wurde zusätzlich die Reduktase aus *Ammi majus* über RT-PCR isoliert, exprimiert, die Funktionalität des rekombinanten Enzyms über die Reduktion von Cytochrom C bewiesen und dem Enzymtest zugegeben.

Die CPR aus *Ammi majus* hat auf Proteinebene 97 % Identität mit der CPR2 aus *Petroselinum crispum*. Dieses Ergebnis verstärkt weiter die Vermutung, dass die beiden Gattungen im engen evolutionären Zusammenhang stehen. Zu den anderen bekanten CPRs

aus Pflanzen besteht maximal 72 % Identität. Viele Pflanzen besitzen mehrere CPRs, vermutlich um sich an physiologische Gegebenheiten anzupassen. Zum Beispiel kommen in *Arabidopsis thaliana* zwei CPRs (ATR1 und ATR 2) vor, wovon die eine (ATR2) induzierbar ist. Auch aus *Petroselinum crispum* sind zwei CPRs isoliert worden, die differentiell reguliert werden (Koopmann und Hahlbrock, 1997). Die Induktion auf Transkriptionsebene der CPR2 aus Petersilie lässt vermuten, dass sie funktionell mit der Furanocumarinbiosynthese assoziiert ist. Ob die isolierte CPR aus *Ammi majus* induziert wird und ob es in *Ammi majus* wie in *Petroselinum crispum* 2 CPRs gibt, ist noch zu klären.

Ein wichtiger Punkt ist die Kontrolle der Expression. Zur Überprüfung der Expression sind verschiedene Parameter zu analysieren. Bei einer Expression mit dem Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO® kann ein Immunoblot der den His_6 Tag ausnutzt, durchgeführt werden (Jennewein *et al.*, 2003). Unabhängig vom Vektor und Expressionssystem kann in allen Fällen das CO-Differenzspektrum gemessen werden, dessen Soret-Bande bei 450 nm spezifisch für Cyt P450 ist. Hierbei bindet das CO als sechster Ligand an das Häm-Eisen. Die Testung der Aktivität der CPR dient zur Kontrolle der Mikrosomenpräparation.

4.4 Sequenz 1 - Zimtsäure 4-Hydroxylase

Nachdem die fünf Cyt P450 aus *Ammi majus* in den Expressionsvektor ligiert worden sind, wurde dann mit der Funktionsanalyse begonnen. Die Datenbankanalyse der isolierten Cyt P450 Sequenzen deutet im Falle der Sequenz 1 schon auf eine Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) hin. Es wurde mit dieser Sequenz begonnen, da zum einen sich mit der C4H die Expression etablieren und testen liess, weil das Substrat leicht zugänglich ist. Zum anderen steht die C4H im direkten Zusammenhang mit der Furanocumarinbiosynthese, da das Umbelliferon eine Vorstufe der Furanocumarine darstellt und vermutlich aus 4-Cumarsäure gebildet wird. Außerdem kann an ihr die Wirkung von Psoralenen als Hemmstoffe untersucht werden.

Datenbankvergleiche zeigten eine auffallend hohe Homologie der C4Hs aus *Ammi majus* und *Petroselinum*, die mit cDNA aus *Ammi majus* Keimlingen bestätigt wurde. Sie beschränkt sich nicht nur auf Cyt P450, da die Sequenzen der Kaffeat O-Methyltransferase (Hehmann *et al.*, 2003) und der CPR aus *Ammi majus* ebenfalls eine Homologie über 98 % zu den entsprechenden Enzymen aus *Petroselinum crispum* haben. *Petroselinum crispum* und *Ammi majus* scheinen so nah verwandt zu sein, dass die bisher bekannten Enzyme aus dem Phenylpropanstoffwechsel hoch konserviert sind. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass es einen engen evolutionären Zusammenhang innerhalb der Familie der Apiaceae gibt.

Hier wären weitere Untersuchungen der Entwicklung der einzelnen Gattungen der Apiaceae interessant. Die C4Hs aus *Ammi majus* und *Petroselinum crispum* unterscheiden sich nur in 7 Aminosäuren und katalysieren die gleiche Reaktion. Dies ist nicht selbstverständlich, weil zum Beispiel bei zwei Cyt P450 aus der Maus (P45015 alpha und P450coh), die sich nur in 11 Aminosäuren unterscheiden, sich völlig andere katalytische Aktivitäten zeigen. P45015 alpha katalysiert eine Steroidhydroxylierung, P450coh die Hydroxylierung von Cumarin. Nach einer Mutation von nur einer Aminosäure konnte die Substratspezifität von P450coh von Cumarin zum Steroid geändert werden (Lindberg und Negeshi, 1989). Dieses Beispiel macht deutlich, dass eine hohe Homologie nicht unbedingt zur gleichen katalytischen Funktion führt, wie es bei *Am*CYP73A41 der Fall ist.

Da bis heute kein pflanzliches Cyt P450 kristallisiert worden sind, dienen Homologie-Modelle von kristallisierten bakteriellen und eukaryotischen Cyt P450 zur Darstellung der Struktur. Die Tertiärstruktur von Cyt P450 besteht aus zwei Regionen, eine Helix-reiche mit den Helices D, E, I, J, K, L, und eine, die reich an ß-Faltblättern ist. Daneben gibt es noch die Hämbindungsregion. Eine genaue Untersuchung der Sequenz von *Am*CYP73A41 lieferte alle konservierten Bereiche von Cyt P450.

Hydrophober Membrananker **Prolinreiche Region/ A-Helix**
M M D F V L L E K A L L G L F I A T I V A I T I S K L R G K K L K L P P G P I P V P V F G N W L Q V G D D L N Q R N L V E Y A

K K F G D L F L L R M G Q R N L V V V S S P D L A K D V L H T Q G V E F G S R T R N V V F D I F T G K G Q D M V F T V Y S

E-Helix
E H W R K M R R I M T V P F F T N K V V Q Q Y R F G W E D E A A R V V E D V K A N P E A A T N G I V L R N R L Q L L M Y

N N M Y R I M F D R R F E S V D D P L F L K L K A L N G E R S R L A Q S F E Y N F G D F I P I L R P F L R G Y L K L C Q E I K

I-Helix
D K R L K L F K D Y F V D E R K K L E S I K S V G N N S L K C A I D H I I E A Q E K G E I N E D N V L Y I V E N I N V A A I E T

J-Helix **K-Helix**
T L W S I E W G I A E L V N N P E I Q K K L R H E L D T V L G A G V Q I C E P D V Q K L P Y L Q A V I K E T L R Y R M A I P L

Meander **PERF-Motiv**
L V P H M N L H E A K L A G Y D I P A E S K I L V N A W W L A N N P A H W N K P D E F R P E R F L E E E S K V E A N G N D

Hämbindungsregion
F K Y I P F G V G R R S C P G I I L A L P I L G I V I G R L V Q N F E L L P P P G Q S K I D T A E K G G Q F S L Q I L K H S T I V C

K P R S S

Abb. 55: Lage der konservierten Motive in *Am*CYP73A41

Nahe dem N-Terminus befindet sich die Prolinreiche Region mit der Konsensussequenz [PPGPxGxP]; es folgt in der I-Helix die Sauerstoffbindungsregion [(A/G)Gx(D/E)T(T/S)],

die dem Protonentransfer zum Eisen dient; am höchsten konserviert ist die Hämbindungsregion mit der Konsensussequenz [PFGxGRRx**C**xG]; das enthaltene Cystein ist von großer Bedeutung, da es das Häm kovalent bindet. Diese Regionen sind auch in *Am*CYP73A41 zu finden, allerdings mit einigen Besonderheiten, die von Schalk *et al*. (1999) untersucht worden sind. Sie fanden in allen Cyt P450 der Familie CYP73 in der Sauerstoffbindungsregion [(A/G)Gx(D/E)**T**(T/S)] das so genannte Ala-Ala-Motiv. Dieses ungewöhnliche Motiv befindet sich in *Helianthus tuberosus* CYP73A1 3 bzw. 4 Aminosäuren vor dem Threonin (grau unterlegt). Normalerweise ist dort ein Prolin oder Glycin zu finden, dass für die Struktur der I-Helix wichtig ist. Warum dieses Ala-Ala-Motiv vorhanden ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Die zweite abweichende Region befindet sich in der Hämbindungsregion [PFGxGRRx**C**xG]. In Position C+1 befindet sich ein Prolin, was im Unterschied zu tierischen Cyt P450 in vielen pflanzlichen Cyt P450 der Fall ist. Das Prolin scheint eine große Rolle bei der korrekten Orientierung des Häms und der Stabilität des Proteins zu spielen.

Schoch *et al.* (2003) haben basierend auf einem Homologie-Modell aus vier kristallisierten bakteriellen Cyt P450 und durch „site-directed mutagenesis“ Substraterkennungsregionen im aktiven Zentrums von CYP73A1, der C4H aus *Helianthus tuberosus* (Teutsch *et al*., 1993), herausgearbeitet. Es hat sich gezeigt, dass N302 und I371 Schlüsselaminosäuren für die Substratbindung und die Orientierung während der Katalyse sind. An der korrekten Positionierung der Zimtsäure ist zusätzlich A306 beteiligt und K484 spielt unter anderem eine Rolle bei der initialen Substratbindung. Diese Aminosäuren sind in *Am*CYP73A41 konserviert, nur um eine Position verschoben: N303, I372, K485.

Nachdem die Identität von *Am*CYP73A41 als Zimtsäure 4-Hydroxylase durch Messung der katalytischen Aktivität des rekombinanten Enzyms gesichert war, wurde das Enzym charakterisiert. Es sind bereits C4Hs aus verschiedenen Pflanzen kloniert worden, jedoch sind nur wenige vollständig biochemisch untersucht worden. Die Parameter, die für *Am*CYP74A41 gemessen wurden, weichen nur geringfügig von den Daten für heterologe C4Hs ab.

Neben diesen biochemischen Daten ist auch die Transkriptionsmenge von Interesse. C4Hs sind unter anderem durch Licht, Verwundung und pilzliche Elicitoren induzierbar, wobei die Induktion auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Die Northern-Blot Analyse hat die Induktion durch pilzlichen Elicitor auf transkriptioneller Ebene für *Am*CYP73A41 bestätigt. Mizutani *et al*. (1997) haben daneben noch unter anderem die Transkriptmengen der 4-CL und der PAL in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Alle drei Enzyme des generellen

Phenylpropanwegs zeigen 1 Stunde nach Lichtinduktion einen 3-fachen Anstieg, nach Verwundung haben sie ihr Maximum nach 2 Stunden. Logemann *et al.* (1995) haben zuvor schon eine Korrelation zwischen der PAL und der 4-CL in *Petroselinum crispum* nachgewiesen. Diese Expressionsmuster zeigt deutlich die konzertierte Induktion der Enzyme des generellen Phenylpropanwegs.

Die Hemmversuche von CYP73A41 mit Psoralen und 8-MOP hatten zum Ziel, die Effekte von Furanocumarinen auf die C4H aus einer Pflanze, die selber Furanocumarine bildet, zu testen. Furanocumarine sind als MBIs („mechanism based inhibitors“) von Cyt P450 aus Mensch, Tier und Pflanze bekannt, sie werden also im klatalytischen Zyklus zu einer Verbindung, die hemmend wirkt. Da die C4H unter anderem an der Biosynthese des Umbelliferons beteiligt ist, steht sie im direkten Zusammenhang mit der Furanocumarinbiosynthese. Es stellt sich also die Frage, ob CYP73A41 in Gegenwart der Psoralene aktiv ist und ob sie ab einer bestimmten Konzentration an Psoralenen inaktiviert wird, um so die Psoralenbiosynthese zu regulieren. Gravot (2002) hat bei der C4H aus *Helianthus tuberosus* (CAP73A1) gezeigt, dass diese in der Gegenwart von NADPH bis zu 85 % durch Psoralene gehemmt wird. CYP73A10 aus *Petroselinum cripsum* und CYP73A32 aus *Ruta graveolens* werden in Gegenwart von NADPH um den Faktor 8-17 weniger effizient inaktiviert. Die Aktivität der C4H aus *Ammi majus* (CYP73A41) wurde bei Konzentrationen bis zu 100 µM Psoralen bzw. 8-Methoxypsoralen nur ca. 30 % gehemmt. Die Hemmung erwies sich zudem als unabhängig von NADPH, MBIs im engeren Sinne erfordern jedoch eine enzymatische Reaktion unter Beteiligung von NADPH. In *Helianthus tuberosus*, einer Pflanze, die keine Furanocumarine bildet, wirken die Psoralenen also deutlich als MBIs, wogegen die C4H aus *Ammi majus* eine gewisse Toleranz gegenüber Psoralenen zeigt und die Hemmung unabhängig von NADPH erfolgt. CYP73A10 und CYP73A32 werden weniger stark inaktiviert als CYP73A1, jedoch in Gegenwart von NADPH. Bestimmte Regionen oder auch einzelne Aminosäuren der Enzyme müssen sich also im Laufe der Evolution verändert haben, was noch weiter zu untersuchen ist.

Dass nicht alle Furanocumarine bei allen Cyt P450 als MBIs wirken, haben Scott *et al.* (2000) an CYP6D1 der Hausfliege (*Musca domestica*) gezeigt. Xanthotoxin hemmt CYP6D1, aber nicht als MBI, da die Inhibition nach Vorinkubation mit und ohne NADPH gleich hoch ist. Die Hemmung von CYP6D1 aus der Hausfliege ist verantwortlich für Resistenz gegen Pyrethroide, die als Insektizide eingesetzt werden. Zum Beispiel wird das Insektizid Cypermethrin durch CYP6D1 hydroxyliert. Die Bedeutung der Verabreichung solcher Inhibitoren beruht auf der synergistischen Wirkung mit Pyrethroid-Insektiziden, was bedeutet,

dass deren Toxizität durch verminderten Abbau steigt. Ein weiteres Beispiel sind die Cyt P450 von Insekten, die bevorzugt auf Furanocumarin-haltigen Pflanzen leben. Die Cyt P450 dieser *Papilio*-Arten bauen Psoralene ab, werden aber nicht durch diese inaktiviert.

Solche Hemmversuche könnten auch zur Aufklärung noch unbekannter Biosynthesewege ausgenutzt werden. Bei Hemmung der C4H aus *Helianthus tuberosus* (CYP73A1) durch PIP (Piperonylsäure) und gleichzeitiger Elicitierung steigt der Gehalt an Salicylsäure stark an (Schoch *et al*., 2002). Dieser Effekt könnte bei der Untersuchung der Furanocumarin- und Salicylsäurebiosynthese eingesetzt werden (Schoch *et al*., 2002). Durch Blockade der C4H *in vivo* könnte die Bildung der Furanocumarine unterdrückt werden, da die Vorstufe Umbelliferon aus dem Phenylpropanstoffwechsel stammt. Dies setzt allerdings voraus, dass eine Pflanze ohne die wichtige C4H oder ihre Isoformen lebensfähig ist.

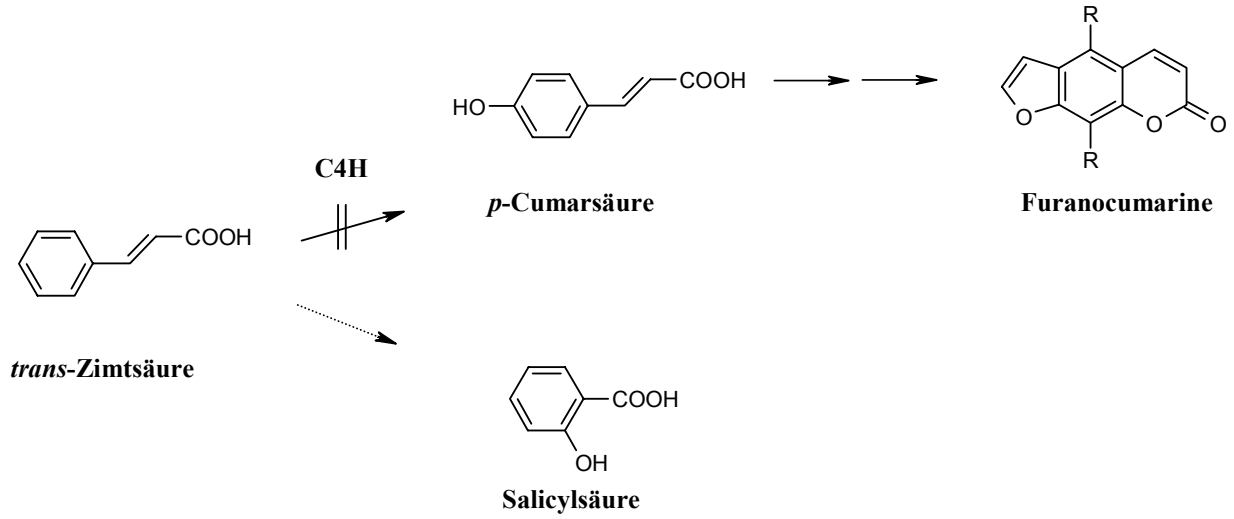


Abb. 56: Effekte auf die Biosynthesewege durch der Hemmung der C4H

4.5 Sequenz 2 (*Am*CYP71AJ1)

Die zweite isolierte cDNA aus *Ammi majus* hat im Datenbankvergleich eine Homologie von 46 % zur Menthofuransynthase (MFS) aus *Mentha* x *piperita* (Bertea *et al*., 2001). Sie wurde durch Dr. David Nelson (Committee for Standardized Cytochrome P450 Nomenclature) als CYP71AJ1 eingeordnet.

Da die Induzierbarkeit der Enzyme der Psoralenbiosynthese ein wichtiges Kriterium ist, wurde diese von *Am*CYP71AJ1 in einer Northern-Analyse untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Induktion nach einer lag-Phase von etwa 2 Stunden. Bei diesem Enzym handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein induzierbares Enzym der unspezifischen Abwehr, eventuell sogar aus der Psoralenbiosynthese. Daher ist eine Korrelation des transkriptionellen Induktionsverlaufes von CYP71AJ1 mit der Induktion der Enzyme der

Furanocumarinbiosynthese interessant. Aus Vorarbeiten des Arbeitskreises ist bekannt, dass die Enzyme der Furanocumarinbiosynthese nach Behandlung der Zellkulturen mit pilzlichem Elicitor einen deutlichen Aktivitätsanstieg zeigen und dass Furanocumarine ins Medium ausgeschieden werden. Die Versuche wurden sowohl mit Zellkulturen von *Ammi majus* als auch *Petroselinum crispum* durchgeführt. Im Falle von Petersilie wurde für die Bergaptol O-Methyltransferase (BMT), einem spezifischen Enzym der Psoralenbiosynthese, die de novo Induktion nachgewiesen. Dies trifft auch für die BMT aus *Ammi majus* zu (Hehmann *et al.*, 2003). Auch *Am*CYP71AJ1 wird auf Transkriptionsebene induziert.

Im Zusammenhang mit *Am*CYP71AJ1 müssen besonders die Cyt P450 der Psoralenbiosynthese also die Marmesinsynthase, die Psoralensynthase und die Psoralen 5-Monooxyganse berücksichtigt werden. Die Marmesinsynthase erreicht ihre maximale Aktivität nach 12 Stunden Induktion mit *Pmg*, die Psoralensynthase und Psoralen 5-Monooxygenase erst nach ca. 24 Stunden (Hamerski und Matern, 1988a). Die Methyltransferasen stehen am Ende der Furanocumarinbiosynthese, was einen früheren Anstieg der Cyt P450 wahrscheinlich macht. Die BMT hat ihr Maximum der Transkriptmenge bei 7 Stunden (Hehmann *et al.*, 2003). Die Transkriptmenge der Xanthotoxol O-Methyltransferase (XMT) hat ihr Maximum nach 10 h (Hauffe, 1988). Für die Marmesinsynthase könnte eine deutlich erhöhte Transkriptmenge in einem Zeitraum von 6-8 Stunden nach Induktion erwartet werden. Allerdings kann die Spanne auch länger sein. Batard *et al.* (1997) haben bei CYP73A1 eine erstaunlich lange Verzögerung von 15 bis 20 Stunden zwischen der maximalen mRNA-Akkumulation und der maximalen Enzymaktivität nachgewiesen, was bisher noch nicht erklärt werden konnte. Im Northern-Blot steigt die mRNA von *Am*CYP71AJ1 kontinuierlich bis zum letzten Messpunkt von 8 Stunden an, so dass es sich um eines der drei Enzyme handeln kann. Durch den recht frühen Anstieg der mRNA kommen hier am ehesten die Marmesin- und Psoralensynthase in Frage. Da die Vorstufe der Furanocumarine, das Umbelliferon aus dem Phenylpropanweg stammt, ist auch das Ergebnis der Northern-Analyse der C4H aus *Ammi majus* erwähnenswert. Sie zeigt ein Maximum der Transkriptmenge nach 3,5 Stunden, was erwarten lässt, dass die Transkriptmenge der Marmesinsynthase bzw. Psoralensynthase erst später erreicht wird. Dies würde den Induktionsverlauf von *Am*CYP71AJ1 erklären.

Enzym	Maximum der RNA	Maximum der Enzmyaktivität	Literatur
Prenyltransferasen	nicht bekannt	10-14 h und 30 h	Hamerski *et al.*, 1990
Marmesinsynthase	nicht bekannt	12 h	Hamerski und Matern, 1988a
Psoralensynthase	nicht bekannt	24 h	Hamerski und Matern, 1988a
Psoralen 5-Monooxygenase	nicht bekannt	20-24 h	Hamerski und Matern, 1988b
Xanthotoxol O-Methyltransferase	10 h		Hauffe, 1988
Bergaptol O-Methyltransferase	17,5 h	30 h	Hauffe, 1988
Bergaptol O-Methyltransferase	7 h		Hehmann *et al.*, 2003

Tab. 11: Induktion der Enzyme der Furanocumarinbiosynthese

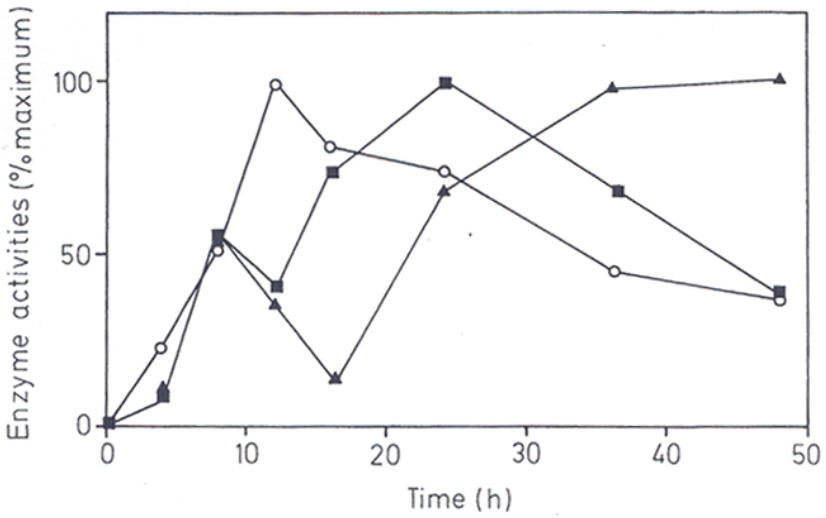


Abb. 57: Enzymaktivitäten der O-Prenyltransferase (▲), der Marmesinsynthase (■) und der Psoralensynthase (○)
(entnommen aus Hamerski und Matern, 1988a)

Im Anschluss an die Northern Analyse wurde *Am*CYP71AJ1 auf den Umsatz von verschiedenen Substraten getestet. Nach der Datenbankanalyse und dem Northern Blot kommen mehrere Substrate in Frage: (+)-Pulegon, das Substrat der MFS, und Demethylsuberosin und Marmesin als Substrate der Marmesin- bzw. Psoralensynthase. Da bisher kein Menthofuran, ein Monoterpen vom *p*-Menthan-Typ, in *Ammi majus* beschrieben worden ist, katalysiert das Enzym wahrscheinlich nicht dessen Bildung. Zudem lässt die geringe Homologie mit anderen bekannten Cyt P450 auf ein neues Enzym schließen. Weil der

Induktionsverlauf zu der Marmesin- und Psoralensynthase passt, wurden weiterhin Demethylsuberosin und Marmesin in Erwägung gezogen.

Im Zusammenhang mit der MFS könnte ein Vergleich der Reaktionsmechanismen der Menthofuransynthase und der Marmesinsynthase eventuell Informationen auf die Funktion von *Am*CYP71AJ1 geben. Bei der Biosynthese von Menthofuran, die in glandulären Trichomen stattfindet, wird wie bei der Furanocumarinbildung DMAPP aus dem von Mevalonat unabhängigen Weg eingebaut. Die MFS hydroxyliert die syn C9-Methylgruppe von (+)-Pulegon, was intramolekular zur spontanen zyklischen Lactolbildung zum Hemiketal und anschließend zur Dehydrierung zum Furan führt (Bertea *et al.*, 2001).

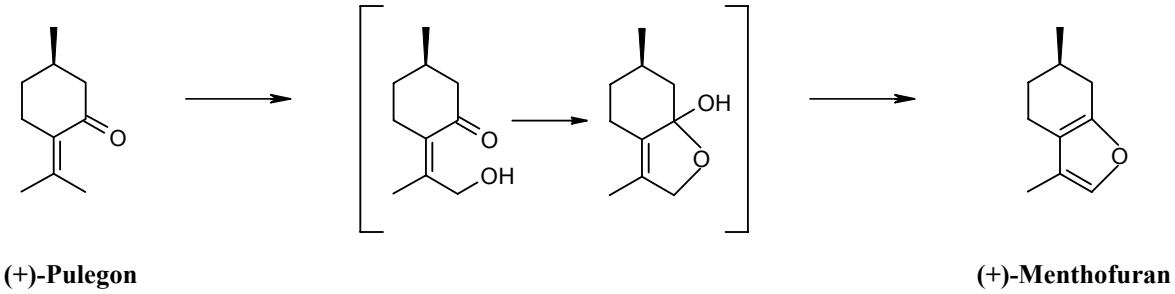


Abb. 58: Bildung von (+)-Menthofuran durch die MFS

Brown *et al.* (1970) haben zwei verschiedene hypothetische Mechanismen für die Bildung von Marmesin diskutiert. Der eine Mechanismus (a) ist wie folgt beschrieben: Ein nucleophiler Angriff der Hydroxylgruppe könnte eine Öffnung des Epoxids induzieren und zu einer spontanen Zyklisierung zum Furanring führen.

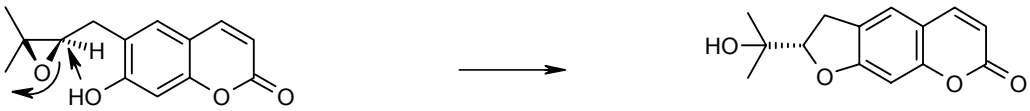


Abb. 59: Hypothetisher Mechanismus a) der Marmesinsynthase

Bei dem anderen Mechanismus (b) findet eine Epoxidierung der Doppelbindung des Prenylrestes statt. Unter oxidativer Öffnung des Epoxids wird dann ein Diol gebildet. Anschließend wird in einer S_N-2-Reaktion unter Inversion der Konfiguration intramolekular zum Marmesin verethert. Beide Mechanismen konnten jedoch bisher *in vitro* nicht bestätigt werden.

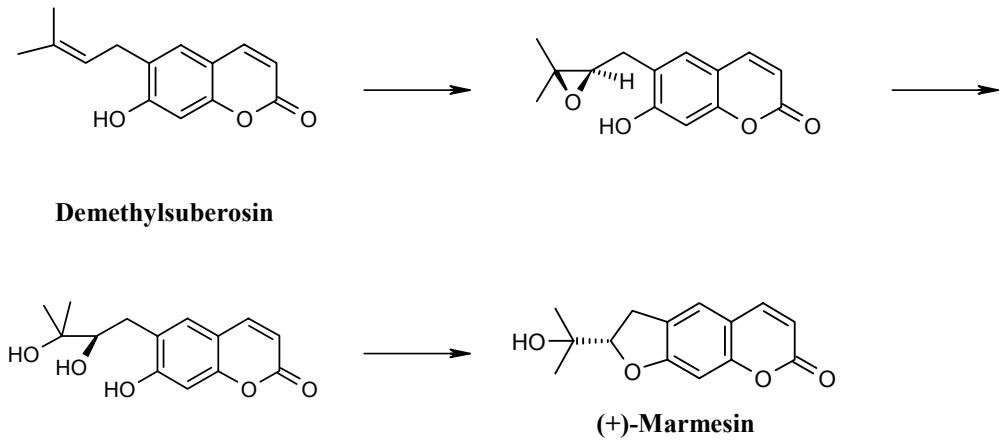


Abb. 60: hypothetischer Mechanismus b) der Bildung von Marmesin

Aus mechanistischer Sicht ist ein Rückschluss auf das mögliche Substrat und die katalysierte Reaktion (Epoxidierung bei der Marmesinsynthase versus Hydroxylierung bei der Menthofuransynthase) von *Am*CYP71AJ1 nicht möglich.

Die Annahme, dass CYP71AJ1 (+)-Pulegon nicht umsetzt, wurde im Enzymtest entsprechend der Veröffentlichung von Bertea *et al.* (2001) erhärtet, da kein Umsatz beobachtet werden konnte. Der Grund kann jedoch auch an der Nachweisgrenze bei Dünnschichtchromatographie liegen oder eine mangelnde Expression sein.

Die Substrate [3-^{14}C]Demethylsuberosin und [3-^{14}C]Marmesin müssen neu synthetisiert werden. Sie liegen zwar aus Altbeständen vor, aus Zeitgründen und wegen Fokussierung auf die Klonierung wurde jedoch der Umsatz durch native Mikrosomen aus *Ammi majus* nicht überprüft. Trotzdem wurde in ersten vorläufigen Tests das [3-^{14}C]Demethylsuberosin und das [3-^{14}C]Marmesin aus Altbeständen eingesetzt. Bei beiden Substraten konnte kein Umsatz beobachtet werden. Unter der Annahme, dass es sich um die Marmesinsynthase bzw. Psoralensynthase handelt, ergeben sich hieraus zwei Möglichkeiten. Zum einen kann das DMS durch lange Lagerung nicht mehr detektiert werden, zum anderen kann es mit zu schwacher oder fehlender Expression erklärt werden. Ein weiteres Problem könnte die geringe Stabilität von CYPs bei *in vitro* Enzymtests sein, da im Laufe der Katalyse Sauerstoffradikale und Peroxide durch die CPR gebildet werden.

Der ORF ist vermutlich vollständig. Da die Mikrosomen analog zu den aktiven C4H-Mikrosomen präpariert worden sind und die Aktivität der CPR in den Mikrosomen bestätigt worden ist, kann ein Fehler bei der Mikrosomenherstellung ausgeschlossen werden. Wegen fehlender Technik kann die Expression nicht kontrolliert werden. Zur Verbesserung der Expressionsbedingungen wurde ein weiteres Expressionssystem getestet.

Da aus anderen Pflanzen bekannt ist, dass bei manchen Cyt P450 die Hefe-eigene Reduktase und das Cyt b_5 als Elektronenlieferant nicht ausreichen, muss dieser Aspekt bei der Expression beachtet werden. So ist zum Beispiel bei der F3`5`H aus der Anthocyaninbiosynthese auch Cyt b_5 als Kofaktor notwendig (De Vetten et al., 1999). Hier reicht oft für eine funktionelle Expression die Homologie des pflanzlichen mit hefeeigenen Cyt b_5 nicht aus (Urban *et al.*, 1990). Analog dazu können die Ähnlichkeiten der CPRs der Hefe und der Pflanzen nicht ausreichen. Aus diesen Gründen wurde der ORF in den Hefevektor pYeDP60 (Pompon *et al.*, 1996) einkloniert und der Klon in verschiedene Hefestämme transformiert, unter anderem in den Stamm WAT11, der die Reduktase ATR1 aus *Arabidopsis thaliana* exprimiert. Auch dieser Ansatz zeigte keinen Umsatz von [3-^{14}C]Demethylsuberosin, was auf ein zerfallenes Substrat hinweisen kann. Zusätzlich wurden in einem Test die CPR-Mikrosmen aus *Ammi majus* zugegeben, was aber ebenfalls zu keinem Umsatz von [3-^{14}C]Demethylsuberosin führte.

Um den Zusammenhang von *Am*CYP71AJ1 mit der Furanocumarinbiosynthese zu klären, muss als nächstes das Demethylsuberosin neu synthetisiert werden und sicher gestellt werden, dass die Expression funktioniert.

4.6 Sequenz 3 (*Am*CYP98A21)

Als nächstes wurde die Sequenz 3 näher untersucht. Datenbankvergleiche haben bei dieser Sequenz eine hohe Ähnlichkeit mit der *Arabidopsis* C3H (CYP98A3) gezeigt, die eine 3-Hydroxylierung im generellen Phenylpropanweg katalysiert. Nach Klassifizierung durch Dr. David Nelson (Committee for Standardized Cytochrome P450 Nomenclature) wurde sie als CYP98A21 eingeordnet. Die Hydroxylierungen im Phenylpropanstoffwechsel am C3, C4 und C5 des Phenylpropangrundkörpers erfolgen alle durch Cyt P450. Bis heute ist allerdings noch unklar, ob die 2-Hydroxylierung ebenfalls durch ein Cyt P450 katalysiert wird.

Die Sequenzen der C4H und die der Ferulasäure-5-Hydroxylase (F5H; CYP84A1; Meyer *et al.*, 1996) sind schon länger bekannt. Für die 3-Hydroxylierung sind drei verschiedene Enzyme beschrieben worden, keines davon konnte bisher auf molekularer Ebene bestätigt werden: Eine Zn^{2+}-abhängige Dioxygenase (Kneusel *et al.*, 1989), eine lösliche FAD-abhängige Hydroxylase (Kamsteg, 1981) und eine Polyphenoloxidase (Wang, 1997). Kürzlich ist die Klonierung der C3H (CYP98A3), einem Cytochrom P450, gelungen. Schoch *et al.* (2001) verwendeten dazu einen bioinformatorischen Ansatz, Franke *et al.* (2002a) Mutanten von *Arabidopsis*. Die Frage des Substrats ist jedoch noch nicht geklärt, da die Arbeitsgruppen unterschiedliche Affinitäten gemessen haben. Ebenfalls ungeklärt bleibt die

genaue Reihenfolge der Ringmodifikationen (Veresterung, Hydroxylierung, Methylierung). Die 3-Hydroxylierung könnte an der freien Säure, deren Estern oder nach CoA-Aktivierung erfolgen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die freie Säure für eine Hydroxylierung ungeeignet ist (Schoch *et al*., 2001). Da die apparente K_m von CYP98A3 für *p*-Cumarat sehr hoch ist, wären hohe Mengen an *p*-Cumarat im Cytoplasma erforderlich. Der von Franke *et al*. (2002a) getestete Cumarsäuremethylester ist bisher nicht als Zwischenprodukt des Phenylpropanstoffwechsels bekannt, so dass er wahrscheinlich kein physiologisches Substrat ist. Des Weiteren kommen die Cumarsäureester von China- und Shikimisäure in Frage (Schoch *et al*., 2001; Gang *et al.*, 2002), diese Ester werden jedoch nicht weiter durch OMTs und CCoAOMTs methyliert (Schoch *et al*., 2001). Im Gegensatz zum Cumarsäuremethyester kommen die Cumarsäureester von Shikimi- und Chinasäure natürlich in der Pflanze vor. Die entsprechenden Acyltransferasen (CST und CPLT), die zu dem Cumarester der Shikimisäure führt, ist aus *Ocimum basilicum*, partiell gereinigt worden (Gang *et al*., 2002). Vor kurzem ist die Klonierung der Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Quinat hydroxycinnamoyl-transferase (HCT) aus Tabak gelungen. Sie überträgt Shikimat und Quinat auf *p*-Cumaroyl-CoA bzw. Caffeoyl-CoA (Hoffmann *et al*., 2003). Nach heutigem Kenntnisstand erfolgt also die 3-Hydroxylierung an den Konjugaten nach CoA-Aktivierung. Bereits in den 80iger Jahren ist eine 3-Hydroxylase der Cumarsäurester der China- und Shikimisäure in *Daucus carota* (Heller und Kühnl, 1985) und *Petroselinum crispum* (Kühnle *et al*., 1987) entdeckt worden. Weiterhin wäre theoretisch auch möglich, dass die Hydroxylierung am Glucoseester der *p*-Cumarsäure (Tanaka *et al.*, 1991) stattfindet.

Ein ähnliches Phänomen wurde bei der F5H beobachtet, bei der das Ferulat auch nicht das bevorzugte Substrat ist, sondern der entsprechende Alkohol und der Aldehyd (Humphreys *et al*., 1999).

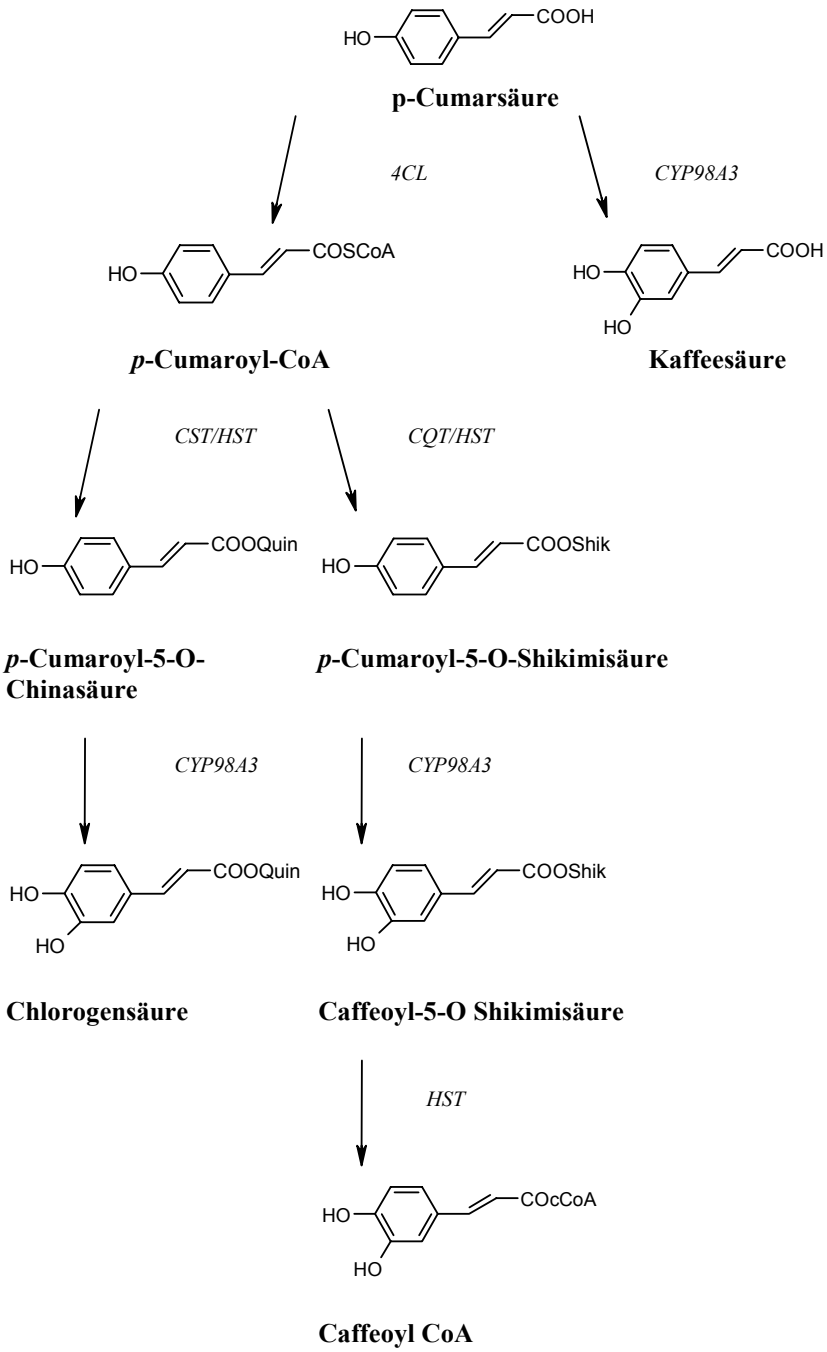


Abb. 61: Veränderungen der *p*-Cumarsäure

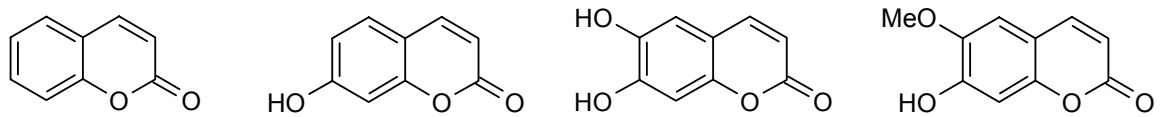
CST, p-Cumaroyl-Coenzym A:Shikimisäure p-Cumaroyltransferase
CQT, p-Cumaroyl-Coenzym A:Chinasäure p-Cumaroyltransferase
HST, Hydroxcinnamoyl-CoA:Shikimisäure/Chinasäure Hydroxycinnamoyltransferase

Eine weitere Überlegung ist, ob die Identität von maximal 83 % ausreicht, um auf eine C3H hinzudeuten. Falls es eine C3H in *Ammi majus* gibt, müsste auch Chlorogensäure bzw. das Caffeoylkonjugat der Shikimisäure vorkommen, denn diese entsteht durch 3-Hydroxylierung aus *p*-Cumaroyl-5-O-Chinasäure bzw. *p*-Cumaroyl-5-O-Shikimiäure. Aus

Ammi majus ist bis heute keine Chlorogensäure beschrieben worden. Auch die genauer untersuchte Pflanze *Petroselinum crispum*, die eine große Analogie zu *Ammi majus* zeigt, enthält nach den heutigen Erkenntnissen keine Chlorogensäure. Neben den Furanocumarinen ist nach Induktion nur die Akkumulation von Butylidenphthaliden bekannt (Hagemeier *et al*., 1999). Es stellt sich also die Frage, welche Funktion CYP98A21 noch haben könnte.

Daher wurde um weitere Informationen über das Enzym zu erlangen, eine Northern-Analyse durchgeführt. Die relative Transkriptmenge steigt nach einer lag-Phase von 1 Stunde zu einem Maximum bei 3,5 Stunden an und sinkt dann wieder ab. Vergleichbare Daten zur C3H sind nicht vorhanden. Dieses Maximum korreliert mit dem Maximum der C4H aus *Ammi majus*. Es würde zu einem Enzym passen, das zu Beginn des Pheylpropanstoffwechsels und der Furanocumarinbiosynthese aktiv ist. In diesem Zusammenhang sind die bis heute ungeklärte 2-Hydroxylierung und die Biosynthese der Hydroxycumarine wichtig.

Das Hydroxycumarin Umbelliferon stellt die direkte Vorstufe der Psoralenbiosynthese dar. Bis heute ist die Biosynthese der Hydroxycumarine nicht vollständig aufgeklärt. Der fehlende Schritt ist die *ortho*-Hydroxylierung, wobei die Katalyse durch ein Cyt P450 vermutet wird. Je nach Hydroxylierungsgrad und Substituenten der Cumarine soll Zimtsäure, Cumarsäure, Kaffeesäure oder Ferulasäure als Ausgangstoff bei der *ortho*-Hydroxylierung dienen. Hierbei ist bis heute jedoch strittig, ob Scopoletin aus der Ferulasäure oder aus Esculetin gebildet wird (NDong *et al*., 2003).



Cumarin **Umbelliferon** **Esculetin** **Scopoletin**

Abb. 62: Cumarine

Gestetner und Conn (1974) haben eine *ortho*-Hydroxylierung des Aromaten und anschließende Cyclisierung zum Cumarin (Benz-2-pyron) in *Melilotus alba* beobachtet, was jedoch nie bestätigt werden konnte. Die *ortho*-Hydroxylierung ist nur indirekt mechanistisch untersucht und ein „NIH-Shift“ ist nachgewiesen worden (Ellis und Amrhein, 1971), was wahrscheinlich macht, dass ein Cyt P450 beteiligt ist, denn ein „NIH-Shift“ wurde bei vielen Hydroxylierungen am Aryl beobachtet (Martin und Reichling, 1992).

Eine 2-Hydroxylierung wird zum Beispiel auch bei der Salicylsäurebiosynthese diskutiert und könnte Modellcharakter für die Cumarinbiosynthese haben. Die Benzoesäure 2-

Hydroxylase (BA2H) hydroxyliert Benzoesäure und wurde in Tabakblättern durch Léon *et al.* (1993) identifiziert, partiell gereinigt und charakterisiert (Lee *et al*., 1995; Léon *et al.*, 1995). Demnach handelt es sich um ein Cyt P450 mit seinen typischen Eigenschaften. Es muss außerdem eine Hydroxylierung von Benzoyl-CoA, Benzoyl-Glucose (Chong *et al*., 2001) oder *trans*-Zimtsäure (Métraux, 2002) in Betracht gezogen werden.

Zur Testung auf eine 3-Hydroxylase-Aktivität wurde CYP98A21 auf den Umsatz von ^{14}C-Cumarsäure getestet. Wie erwartet wurde die freie Säure nicht umgesetzt, wobei jedoch unklar bleibt, ob die Ursache in einer mangelnden Expression liegt. Als nächstes wurde der Cumarsäuremethylester synthetisiert (Synthese durch Edgar Specker), gemäß dem Protokoll von Franke *et al.* (2002a) inkubiert und über HPLC analysiert. Auch hier war kein Umsatz zu detektieren.

^{14}C-Cumarsäure hätte durch eine 2-Hydroxylase-Aktivität eventuell auch in der *ortho*-Position hydroxyliert werden können. Doch bis heute bleibt unklar, wie Umbelliferon, die Vorstufe der Furanocumarine genau gebildet wird und ob ein Cyt P450 beteiligt ist. Die 2-Hydroxylierung könnte wie die 3-Hydroxylierung auch nicht an der freien Säure, sondern den CoA-Estern erfolgen. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Klonierung möglichst vieler Cyt P450 lag, wurden aus Zeitgründen keine weiteren Substrate getestet.

Um zu klären, ob es sich um eine 3-Hydroxylase aus dem Phenylpropanweg handelt, müssten nach Sicherstellung der Expression die Cumarsäureester der Shikimi- und Chinasäure im Enzymtest eingesetzt. Um eventuell eine 2-Hydroxylase-Aktivität aufzudecken, könnten die CoA-Ester der Zimt- und Cumarsäure ausprobiert werden.

4.7 Sequenz 4 (*Am*CYP76B8)

Die vierte Sequenz *Am*CYP76B8 hat die höchste Homologie zur Geraniol 10-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus*. Geraniol ist ein acyclisches Monoterpen und kommt zum Beispiel im ätherischen Öl von *Thymus zygis* (Lamiaceae) und *Cymbopogon winterianus* JOWITT (Poaceae, Citronellgras) vor. Die Geraniol 10-Hydroxylase (G10H, CYP76B6) wurde aus *Catharanthus roseus* gereinigt (Meier *et al*., 1993) und kloniert (Collu *et al*., 2001). Sie katalysiert die Hydroxylierung von Geraniol am C10, einem wichtigen Biosyntheseschritt im Laufe der Iridoiden Monoterpensynthese. Daas Iridoid Loganin liefert über das Secologanin eine Teilstruktur für die große Klasse der Monoterpenalkaloide (z. B. Indolmonoterpenalkaloide). Hierbei werden das Tryptamin aus dem Shikimatweg und das Secologanin aus dem Mevalonatweg zu Strictosidin gekoppelt, und es entstehen die Ajmalicine, Catharanthine und Vindoline. Weder Geraniol noch Loganin oder die iridoiden

Monoterpenalkaloide sind in *Ammi majus* beschrieben worden. So ist fraglich, ob das Enzym diese Umsetzung katalysiert.

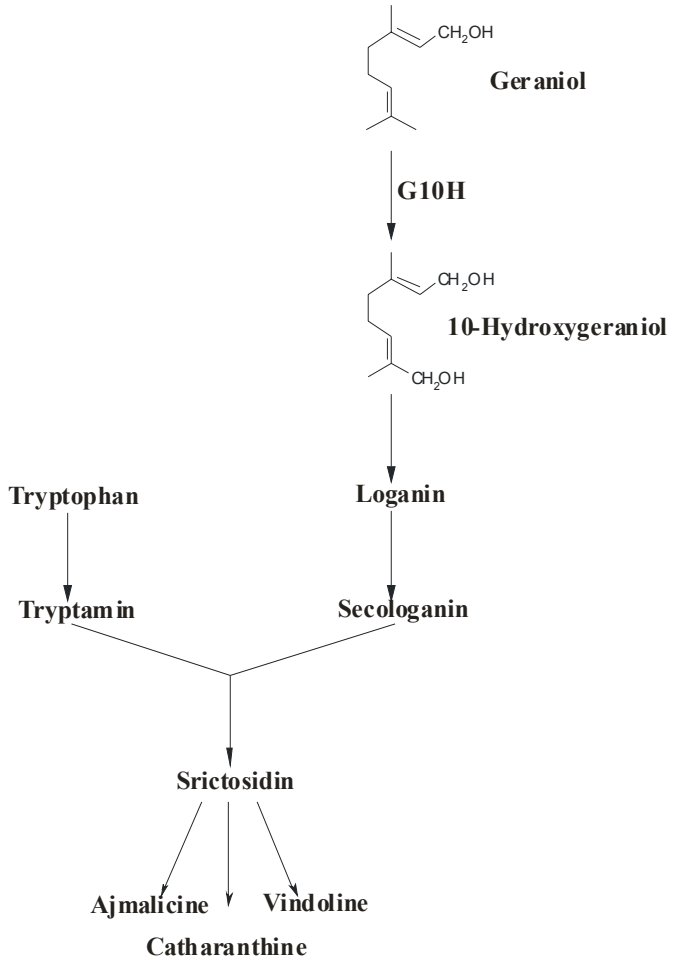


Abb. 63: Bedeutung der G10H in der Alkaloidbiosynthese

Auch hier wurde, um weitere Informationen zu erhalten, eine Northern-Analyse durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Expression der G10H in Zellkulturen von *Catharanthus roseus* mit Methyljasmonat induziert werden kann und ein Maximum der mRNA-Menge nach 8h zu beobachten ist (Collu *et al*, 2001). Ergebnisse der Northern-Analyse von *Am*CYP76B8 zeigen für die elicitierten *Ammi majus*-Zellen im Zeitraum von 0-8 Stunden nach Induktion keine Induktion der relativen Transkriptmenge. Da *Am*CYP76B8 auf Transkriptionsebene nicht durch pilzlichen Elicitor induziert wird, ist auch eine Beteiligung an der Furanocumarinbiosynthese unwahrscheinlich.

4.8 Sequenz 5 (*Am*CYP82H1)

Datenbankvergleiche geben keinen Aufschluss über mögliche Substrate von *Am*CYP82H1. Die Northern Analyse hat gezeigt, dass das Enzym auf transkriptioneller Ebene nicht induziert wird, also mit hoher Wahrscheinlichkeit in keinem Zusammenhang mit der

Furanocumarinbiosynthese steht. Aus diesen Gründen wurde *Am*CYP82H1 nicht weiter untersucht.

Sequenz 4 und 5 haben die Efiizienz der Methode dokumentiert, da auch nicht induzierte Transkripte amplifiziert werden. Meist gibt es in den Pflanzen wenige konstitutiv exprimierte Cyt P450, wie zum Beispiel die Ferulat 5-Hydroxylase (Meyer *et al*., 1996) und die Obtusifoliol 14α-Demethylase (Bak *et al*., 1997). Um das Substrat von *Am*CYP82H1 zu finden, müssten besonders solche Enzyme beachtet werden.

4.9 Evolutionäre Aspekte

Es gibt mehrere evolutionäre Aspekte, die in Verbindung mit Furanocumarinen interessant sind. Dazu zählen die Koevolution zwischen Insekten und Furanocumarin-haltigen Pflanzen und die Beziehung zwischen der Biosynthese der linearen und angulären Furanocumarine. Ein weiterer interessanter Aspekt ist der evolutionäre Zusammenhang der einzelnen Gattungen der Apiaceae. Verschiedene Enzyme von *Ammi majus* weisen eine außerordentlich hohe Homologie zu *Petroselinum crispum* auf, was im Rahmen dieser Arbeit bei der C4H und der CPR beobachtet wurde. Bestätigt wurde dies noch durch die Klonierung der Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase (Hehmann *et al*., 2003).

Sequenzdaten von den Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese könnten bei der Frage der Evolution des Furanocumarinwegs weiterhelfen. In diesem Zusammenhang ist der Begriff der Koevolution wichtig. Koevolution bedeutet eine Änderung der genetischen Komposition einer Spezies als Antwort auf die genetische Änderung einer anderen Spezies. Beispielsweise bilden einige Pflanzen wie *Ammi majus* als Überlebensstrategie Furanocumarine zur Abwehr von Insekten. Einige Insekten haben im Laufe der Evolution Cyt P450 entwickelt, die die Furanocumarine metabolisch inaktivieren können, womit sie die toxische Barriere der Pflanze überwunden haben (Berenbaum und Zangerl, 1998; Berenbaum, 2002). Diese Interaktion zwischen Pflanzen und Herbivoren wurde an *Pastinaca sativa* und dem Herbivor *Depressaria pastinacella* (Berenbaum *et al.*, 1998; Kareiva, 1999) und den Schmetterlingen der Gattung *Papilio* (Lepidoptera: Papilionidae) untersucht. Viele Schmetterlinge dieser Gattung können Furanocumarine entgiften, wobei sich *Papilio polyxenes* (Zebrafalter) sogar auf Furanocumarin-haltige Pflanzen spezialisiert hat.

Bei der Detoxifizierung der Furanocumarine sind Cyt P450 der CYP6B-Genfamilie involviert (Ma *et al*, 1994; Hung *et al*., 1997; Nitao *et al*., 2003; Li *et al.*, 2000). Diese Monooxygenasen sind bereits kloniert, analysiert (Chen *et al*., 2002) und durch Homologie-Modelling und Substrat-Docking ist das katalytische Zentrum untersucht worden (Baudry *et*

al., 2003). In den Sequenzen wurden eine konservierte Substraterkennungssequenz (SRS, substrate recognition site) und konservierte Promotorelemente, die auf Furanocumarine reagieren, identifiziert. Versuche mit dem durch Xanthotoxin induzierbaren CYP6B4v1 haben gezeigt, dass es *in vitro* lineare Furanocumarine in höheren Raten abbaut als die angulären (Hung *et al*., 1997). Messung der katalytischen Aktivitäten der Unterfamilie CYP6B hat gezeigt, dass CYP6B1 aus dem Spezialisten *P. polyxenes* den höchsten Umsatz zeigte und dabei auch die höchste Substratspezifität (Li *et al*., 2003). CYP6B4 von *P. glaucus*, der nur ab und zu Furanocumarin-haltige Pflanzen frisst, ist weniger aktiv und dabei weniger spezifisch. Den geringsten Umsatz zeigte CYP6B17 von *P. canadensis*, der solche Pflanzen nie als Wirt benutzt. Die Bindungstelle der Psoralene könnte eventuell Hinweise auf die Substratbindung bei der Psoralen 5-Monooxygnease und Psoralen 8-Monooxygenase der Psoralenbiosynthese geben.

Hier sind noch viel Fragen offen. Warum haben bestimmte Pflanzen begonnen, Furanocumarine zu bilden? Und warum sind die Insekten nicht auf andere Pflanzen ohne Furanocumarine ausgewichen, sondern haben sich durch die Entwicklung von metabolisierenden Cyt P450 angepasst? War die Konkurrenz groß und das Nahrungsangebot knapp? Die Tatsache, dass Schmetterlinge der Gattung *Papilio* Entgiftungsmechanismen etabliert haben, weist auf einen hohen Selektionsdruck in Richtung Furanocumarin-haltige Pflanzen hin. Dadurch würde die Konkurrenz abnehmen, da sie den Vorteil gegenüber anderen Tieren haben, auch diese Pflanzen fressen zu können. Es gibt nie endgültige Lösungen, sondern nur die Schaffung von ökologischen Nischen.

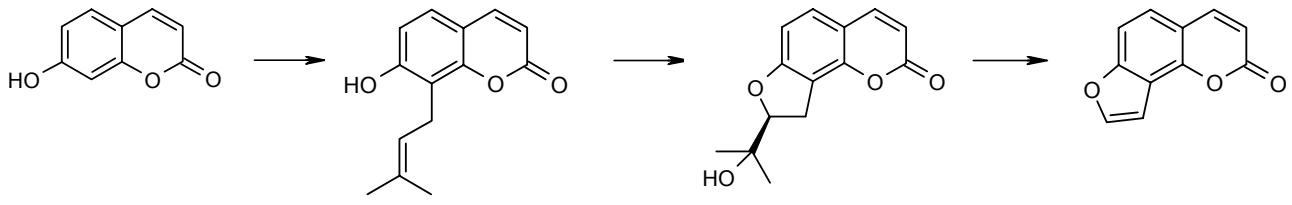
Li *et al*. (2003) nehmen nach Studium der CYP6B-Genfamilie an, dass sich die Spezialisten aus den Generalisten entwickelt haben. Eine Sequenzanalyse der CYP6B-Gene zeigte eine hohe Ähnlichkeit in den Promotoren und Introns (Li *et al*., 2002), wonach sie postulieren, dass sich die Gene durch Duplikation aus einem gemeinsamen Vorgänger entwickelt haben. Allgemein müssen Herbivore nicht nur Furanocumarine sondern viele weitere Pflanzensekundärstoffe entgiften, wobei ebenfalls häufig Cyt P450 involviert sind. Daher wird angenommen, dass die Cyt P450 in den Tieren sich durch Genduplikationen aus einem einzigen Vorgänger entwickelt haben (Gonzales und Nebert, 1990) und so eine neue Funktion erlangten. Eine Genduplikation wird auch bei der Evolution aller anderen Cyt P450 als Ursprung angenommen, was bedeuten würde, dass sich alle Cyt P450 aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben.

Die Induktion von verschiedenen Genen durch Xanthotoxin beschränkt sich nicht nur auf Insekten die Furanocumarine entgiften, sondern kommt auch bei anderen Insekten vor.

Warum diese Cyt P450 durch Xanthotoxin induziert werden, obwohl sie diese nicht metabolisieren, muss noch geklärt werden. Dieses Phänomen könnte damit begründet werden, dass die Promotorregion, die für die Regulation verantwortlich ist, bei der Genduplikation miterfasst wurde (Stevens *et al*., 2000).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Zusammenhang der Biosynthese der angulären und linearen Furanocumarine. Die angulären Furanocumarine sind im Vergleich zu den linearen weniger weit verbreitet. Bis heute ist keine Pflanze bekannt, bei der neben den angulären Furanocumarinen keine vom linearen Typ vorkommen. Eine Mischung aus linearen und angulären Furanocumarinen ist toxischer als die linearen allein, was zeigt dass die angulären Furanocumarine synergistischen wirken, vermutlich durch Inhibition der detoxifizierenden Cyt P450 (Ma *et al*., 1994). Die Biosynthesewege scheinen auf genetischer oder physiologischer Ebene miteinander verbunden. Es wird angenommen, dass sich die Biosynthese der angulären Furanocumarine aus der Biosynthese der linearen durch den von Herbivoren ausgelösten Selektionsdruck entwickelt hat (Wen *et al*., 2003). Die angulären Furanocumarine dienten als Schutz vor den Insekten, die die linearen Furanocumarine abbauen können, doch *P. polyxenes* passte sich an und kann nun mittels Cytochromen beide Arten von Furanocumarinen abbauen.

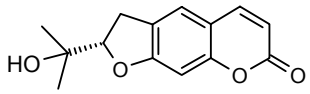
Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse aus der Untersuchung der Biosynthese der angulären Furanocumarine weiter unterstützt. Beide Biosynthesewege haben ähnliche Intermediate (Stanjek und Boland, 1998) und Angelicin wird wie auch das Psoralen durch Hydroxylierungen und Methylierungen verändert (Matern *et al*., 1999). Die Prenylierung des Umbelliferons erfolgt hier allerdings am C8. Die Dealkylierung von (+)-Columbianetin zu Angelicin ist mit *cis*-5-Fluoro(9-D)Columbianetin und der intakten mit Jasmonsäure elicitierten Pflanze *Heracleum mantegazzianum* (Apiaceae) untersucht worden (Stanjek und Boland, 1998). Der genaue Mechanismus wurde dann mit Metall-Porphyrinatkomplexen zur Simulierung von Cyt P450 nachgewiesen. Es hat sich herausgestellt, dass der sterische Verlauf der Umsetzung identisch mit der Bildung von Psoralen aus (+)-Marmesin ist.



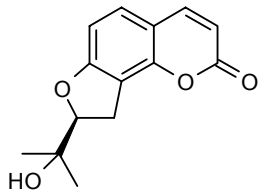
Umbelliferon **Osthenol** **(+)-Columbianetin** **Angelicin**

Abb. 64: Biosynthese der angulären Furanocumarine

Besonders interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob ein einziges Enzym (Psoralensynthase) sowohl das (+)-Marmesin wie auch das (+)-Columbianetin umsetzen kann. Diese Möglichkeit scheint zu bestehen, weil die sterischen Verhältnisse sich im Benzofuran-Teil entsprechen.



(+)-Marmesin



(+)-Columbianetin

Abb. 65: Vergleich der Konfigurationen von (+)-Marmesin und (+)-Columbianetin

4.10 Die Bedeutung der Furanocumarine in Nahrungsmitteln

Praktische Bedeutung hat die Klonierung der Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese eventuell für die Landwirtschaft. Ein erhöhter Gehalt an Furanocumarinen stellt in Gemüse wie dem Sellerie oder der Süsskartoffel durch ihr phototoxisches Potential ein Problem dar. Zum einen kann bei den Erntearbeitern eine Kontaktdermatitis auftreten, zum anderen kann der übermässige Verzehr des Gemüses zu Erythemen führen (Schlatter *et al*., 1991; Ljunggren, 1990). Studien von Coviella *et al*. (2001) haben gezeigt, dass der Gehalt an linearen Furanocumarinen in Sellerie durch den sauren Nebel in kalifornischen Ballungszentren um 540 % in den Blättern und 440 % in den Blattstielen stieg. Die Konzentrationen waren damit 7,5-fach höher als die Menge, die eine Kontaktdermatitis auslöst. Sellerie (Aharoni *et al*., 1996) und die Süsskartoffel (Afek und Orenstein, 2003) sind äusserst anfällig gegen Pilzinfektionen, die ebenfalls zu einem erhöhten Gehalt an Psoralenen führen. In Kalifornien ist *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* das Pathogen, das Sellerie am meisten schädigt und die Furanocumarinbidlung induziert. Daher hat man resistentere Linien gezüchtet, die jedoch einen deutlich höheren Gehalt an Psoralenen haben (Diawara *et al*., 1993). Hier ist allerdings die Phototoxizität ein Problem. Afek *et al*. (1993) haben daher einen weiteren Lösungsansatz entwickelt. Sie haben festgestellt, dass die Vorstufen der linearen und anguläern Furanocumarine Marmesin und Columbianetin 100-fach stärker antifungal wirksam sind als Psoralen und dabei den Vorteil haben, nicht phototoxisch zu sein. Durch einen höheren Gehalt an Marmesin zum Beispiel mittels Blockade der Psoralensynthase könnten die Pflanzen resistenter gegenüber Pilzen werden. Wenn man die Biosynthese der Furanocumarine unterbrechen könnte, hätte man weiterhin die Möglichkeit, den Sellerie in Ballungszentren mit hoher Luftverschmutzung weiterhin anzubauen. Zusätzlich könnte man

eine Interaktion mit Herbiziden verhindern, denn es hat sich gezeigt, dass der Gehalt an Xanthotoxin in Sellerie nach Behandlung mit dem Herbizid Acifluorfen steigt. Auch ein erhöhter Kohlendioxidgehalt in der Luft durch zunehmende Umweltverschmutzung steigert die Furanocumarinproduktion, so dass Berkley *et al*. (1986) schon vor einiger Zeit den Vorschlag machten, resistenteren Sellerie zu züchten, der weniger Furanocumarine enthält.

Erkenntnisse über die molekulare Ebene der Furanocumarinbiosynthese könnten also dazu genutzt werden, den durch Umweltverschmutzung, Insektenfraß und Herbizide gefürchteten hohen Gehalt an Furanocumarinen in Nahrungspflanzen wie Sellerie zu senken. Ein Beispiel für den erfolgreichen Eingriff in die Biosynthese von Nahrungspflanzen ist Cassava. Hier wurde in transgenen Pflanzen durch Inhibition von zwei Cyt P450 (CYP79D1 und CYP79D2) die Produktion der toxischen cyanogenen Glycoside unterbrochen (Siritunga und Sayre, 2003).

4.11 Ausblick

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Klonierung deer Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese zur Aufklärung späterer Schritte der Biosynthese beitragen würde Erstmals liegen molekularbiologische Daten zu fünf verschiedenen Cyt P450 aus *Ammi majus* vor. Die Daten der Northern-Analyse lassen eventuell auf eine Beteiligung von *Am*CYP71AJ1 an der Psoralenbiosynthese schliessen. Dafür kommen aufgrund des zeitlichen Verlaufs der Induktion vor allem die Marmesinsynthase und Psoralensynthase in Betracht. Bisher konnte kein Umsatz beobachtet werden, was experimentelle (schwache Expression, Demethylsuberosin zerfallen) und faktische Gründe (Demethylsuberosin und Marmesin sind nicht die Substrate) haben kann. Um die Frage zu klären, ob es sich um die Marmesinsynthase handelt, muss das Demethylsuberosin und Marmesin am besten mit radioaktiver Markierung synthetisiert werden.

Eine weitere Konsequenz aus der vorliegenden Arbeit ist die Prüfung und Optimierung der Expression. Zur Überprüfung der Expression kann das CO-Differenzspektrum gemessen werden, das in jedem Fall die Anwesenheit von Cyt P450 anzeigt. Eine weitere Möglichkeit ist bei Verwenden von einem Vektor mit His-Tag der Einsatz von Antikörpern, der auf den His_6 Tag zielt. Zur Klärung, ob das Substrat bindet, kann das Substratbindungsspecktrum herangezogen werden. Es gibt Aufschluss darüber, ob das Substrat an das Enzym bindet und überhaupt umgesetzt werden kann. Bei der Aufklärung der Funktion können eventuell Modellsubstrate weiterhelfen, von denen man dann das physiologische Substrat ableiten kann (Schalk *et al*., 1997).

Wenn diese Tatsache geklärt ist, muss die Expression verbessert werden. Die Expression könnte durch eine simultane Expression des Cyt P450 und der CPR aus *Ammi majus* optimiert werden. Ro *et al*. (2002) haben den durch Galaktose induzierbaren dualen Hefeexpressionsvektor pESC-Leu (Stratagene) zur gleichzeitigen Expression der C4H und der CPR in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Dazu sollte allerdings durch eine Northern Analyse sichergestellt werden, dass es sich um eine induzierbare Reduktase handelt. Eventuell kann auch ein Austausch der Codons am N-Terminus der isolierten Cyt P450 erforderlich sein, da sie nicht mit den für Hefen typischen Codons übereinstimmen. Wenn dieser Weg nicht zu einem Umsatz führt, kann auch die Expression in Insektenzellen oder eine Koexpression con Cyt b_5 notwendig sein.

Da es unwahrscheinlich ist, dass induzierbare Cyt P450 erschöpfend kloniert wurden, ist die weitere Aufgabe, mit der Methode nach Fischer *et al*. (2001) noch mehr induzierte Cyt P450 zu klonieren, um die Sequenzdaten zu vermehren. Ein weiteres Ziel kann sein, dabei das Enzym der *ortho*-Hydroxylierung zu klonieren, welches vermutlich auch induziert wird, da die Cumarine unter anderem der Abwehr dienen und das Umbelliferon die Vorstufe der Furanocumarine ist.

Falls es sich bei *Am*CYP71AJ1 tatsächlich um die Marmesin- oder Psoralensynthase handelt, könnte man eine Zelllinie herstellen, die kein Psoralen und dessen Derivate mehr bildet. Die mRNA dieser Zelllinie könnte dann zum Beispiel im Differential Display oder in einer substraktiven Hybridisierung eingesetzt werden und zur Klonierung der anderen Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese führen

Neben den Cyt P450 könnten neue Forschungsergebnisse auch eine Hilfe bei der Isolierung der Prenyltransferasen der linearen und angulären Furanocumarinbiosynthese sein. Lange gab es keine Sequenzdaten zu Prenyltransferasen des Sekundärstoffwechsels, doch kürzlich haben Yazaki *et al*. (2002) zwei cDNAs aus *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae) kloniert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Klonierung der Cyt P450 der Furanocumarinbiosynthese zur Aufklärung späterer Schritte der Biosynthese beitragen würde und eine Manipulation der Phytoalexinproduktion mit genetischen Methoden ermöglichen würde.

5. Zusammenfassung

Pflanzen reagieren auf Pathogenbefall mit einem komplexen System von physiologischen Reaktionen. Auslöser ist die Erkennung von Oberflächenstrukturen der Pathogene, die als Elicitoren wirken. Am Ende der Elicitor-induzierten Signaltransduktionskette steht die Aktivierung von Abwehrgenen. Ein Teilaspekt ist dabei die Akkumulation von Phytoalexinen, im Falle der Apaiceae sind es Furanocunmarine. Aus Einbaustudien und *in vitro*-Messungen ist bekannt, dass an der Biosynthese der Furanocumarine mehrere Cyt P450 beteiligt sind, die durch Hefe oder pilzlichen Elicitor induziert werden können.

Aus cDNA von Elicitor-induzierten *Ammi majus*-Zellkulturen wurden fünf Cyt P450 kloniert, deren Northern-Analyse ergab, dass drei davon auf transkriptioneller Ebene induzierbar sind, wobei *Am*CYP71AJ1 am deutlichsten induziert wird.

Sequenz 1, CYP73A41, wurde funktionell als Zimtsäure 4-Hydroxylase identifiziert und biochemisch charakterisiert. Ihre Eigenschaften entsprechen im Wesentlichen den bereits klonierten C4Hs. Es bleibt die Identifizierung der anderen Cyt P450 durch Verbesserung und Kontrolle der Expression und Suche nach möglichen Substraten. Auf dem Wege zu einer Verbesserung der Expression wurde die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) kloniert mit dem Ziel eine simultane Expression der CPR und des zu untersuchenden Cyt P450 in Hefe durchzuführen.

Im Sequenzvergleich weist Sequenz 2 (*Am*CYP71AJ1) auf der Ebene der Aminosäuren 66 % Ähnlichkeit zur Menthofuransynthase (MFS) aus *Mentha* x *piperita* (Q947B7, Bertea *et al*, 2001) auf. Da kein Menthofuran in *Ammi majus* beschrieben worden, ist es unwahrscheinlich, dass *Am*CYP71AJ1 die Bildung von Menthofuran katalysiert. Die Induktionsstärke und der Induktionsverlauf der relativen Transkriptmenge von *Am*CYP71AJ1 passen zu der Induktion der Marmesinsynthase-Aktivität, einem Cyt P450 der Psoralenbiosynthese. Vermutlich handelt es sich bei *Am*CYP71AJ1 um ein Enzym der unspezifischen Abwehr, eventuell sogar aus der Furanocumarinbiosynthese.

Die Sequenz 3 (*Am*CYP98A21) ist auf Aminosäureebene zu 83 % identisch mit der *Ocimum basilicum* p-Cumaroyl Shikimat 3'-Hydroxylase und ist auf Transkriptiosnebene induzierbar.

Die Sequenz 4 (*Am*CYP76B8) hatte 55 % identische Aminosäuren mit der Geraniol 10-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus*. Der Northern-Blot zeigte im Gegensatz zur G10H aus *Catharanthus roseus* keine Induktion. Eine Zuordnung der nicht induzierten Sequenz 5 (*Am*CYP82H1) kann nicht erfolgen.

Neben der wissenschaftlichen Grundlage haben die Untersuchungen auch praktische Bedeutung. Kenntnisse über die Biosynthese der Furanocumarine sind für den Menschen von Interesse. Es hat sich gezeigt, dass der Gehalt an Furanocumarinen in Sellerie aufgrund von saurem Nebel in kalifornischen Ballungsgebieten stark zunimmt, so dass die Konzentration über der Menge liegt, die beim Menschen nach Verzehr eine Dermatitis auslösen kann. Zudem wird eine solche Pflanze ungeniessbar für Insekten. Indem man regulierend in die Biosynthese eingreift, könnte man Sellerie herstellen, der keine Psoralene enthält, und somit auch in Gebieten mit grosser Luftverschmutzung angebaut werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Abdel-Kader, M. S., 2003. New esters and furocoumarins from roots of *Pituranthos tortuosus*. *J Braz Chem Soc* **14**, 48-51.

Afek, U. und Orenstein, J., 2003. Decreased sweetpotato decay during storage by steam treatments. *Crop Protection* **22**, 321-324.

Afek, U., Carmeli, S., Aharoni, N., Roizer, L., 1993. A suggestion for a new mechanism of celery reistance to pathogens. *Acta Horticulturae* **343, 357-360**.

Afek, U., Orenstein, J., Aharoni, N., 2002. The involvement of marmesin and its interaction with GA_3 and psoralens in parsley decay resistence. *Can J Pathol* **24**, 61-64.

Aharoni, N., Afek, U., Finkelstein, E., Orenstein, J., Dvir, O., Nuriel, E., Carmeli, S., 1996. Impact of celery age and infection by *Botrytis cinerea* on linear furanocoumarin (psoralens) content in stored celery. *Phytoparasitica* **24**, 195-197.

Akashi, T., Aoki, T., Takahashi, T., Nanako, K., Nakamura, I., Ayabe, S., 1997. Cloning of cytochrome P450 cDNAs from cultured *Glycyrrhiza echinata* L. cells and their transcriptional activation by elicitor-treatment. *Plant Science* **126**, 39-47.

Allwood, E. G., Davies, D. R., Gerrish, C., Ellis, B. E., Bolwell, G. P., 1999. Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett* **457**, 47-52.

Allwood, E. G., Davies, D. R., Gerrish, C., Bolwell, G. P., 2002. Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean. *Plant Molecular Biology* **49**, 533-544.

Anterola, A. M., Jeon, J.-H., Davin, L. B., Lewis, N. G., 2002. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. *J Biol Chem* **277**, 18272-18280.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., Sheen, J., 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.

Baedeker, M. und Schulz, G. E., 2002. Structures of two histidine ammonia-lyase modifications and implications fort he catalytic mechanism. *Eur J Biochem* **269**, 1790-1797.

Bak, S., Kahn, R. A., Olsen, C. E., Halkier, B. A., 1997. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the obtusifoliol 14α-demethylase of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, a cytochrome P450 orthologous to the sterol 14α-demethylase (CYP51) from fungi and mammals. *The Plant Journal* **11**, 191-201.

Bak, S., Kahn, R. A., Nielsen, H. L., Møller, B. L., Halkier, B. A., 1998. Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in Escherichia coli of CYP71E1 as amultifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Mol Biol* **36**, 393-405.

Batard, Y., Schalk, M., Pierrel, M.-A., Zimmerlin, A., Durst, F., Werck-Reichhart, D., 1997. Regulation of the cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A1) in jerusalem artichoke tubes in response to wounding and chemical treatments. *Plant Physiol* **113**, 951-959.

Batard, Y., Hehn, A., Nedelkina, S., Schalk, M., Pallett, K., Schaller, H., Werck-Reichhart, D., 2000. Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems. *Arch Biochem Biophys* **379**, 161-169.

Baudry, J., Li ,W., Pan, L., Berembaum, M. R., Schuler, M. A., 2003. Molecular docking of substrate and inhibitors in the catalytic site of CYP6B1, an insect cytochrome P450 monooxygenase. *Protein Engineering* **16**, 577-587.

Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M., 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DD-RT-PCR). *Nucleic Acids Research* **21**, 4272-4280.

Beier, R. C., Ivie, G. W., Oertli, E. H., Holt, D. L., 1983. HPLC analysis of linear furanocoumarins (psoralens) in healthy celery (*Apium graveolens*). *Food Chem Toxicol* **21**, 163-165.

Bell-Lelong, D.A., Cusumano, J.C., Meyer, K., Chapple, D., 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **113**, 729-738.

Berenbaum, M.R., 2002. Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 873-896.

Berenbaum, M. R. und Zangerl, A. R., 1998. Chemical phenoptype matching between a plant and its insect herbivore. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13743-13748.

Beneviste, I., Salaün, J. P., Durst, F., 1978. Phytochrome-mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedlings. *Phytochemistry* **17**, 359-363.

Berkley. S. F., Hightower, A. W., Beier, R. C., Fleming, D. W., Brokopp, C. D., Ivie, G. W., Broome, C. V., 1986. Dermatitis in grocery workers associated with high natural concentrations of furanocoumarins in celery. *Ann Intern Med* **105**, 351-355.

Bertea, C. M., Schalk, M., Karp, F., Maffei, M., Croteau, R., 2001. Demonstration that menthofuran synthase of mint (Mentha) is a cytochrome P450 monooxygenase: Cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **390**, 279-286.

Bethea, D., Fullmer, B., Syed, S., Seltzer, G., Tiano, J., Rischko, C., Gillespie, L., Brown, D., Gasparro, F. P., 1999. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *Journal of Dermatological Science* **19**, 78-88.

Betz, C., Mc Collum T.G., Mayer R.T., 2001. Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in Valencia orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Molecular Biology* **46**, 741-748.

Biggs, D. R., Welle, R., Grisebach, H., 1990. Intracellular localization of prenyltransferases of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis in bean and soybean. *Planta* **181**, 244-248.

Bisignano, G., Sanogo, R., Marino, A., Equino, R., D'Angelo, V., Germanò, R., De Pasquale, R., Pizza, C., 2000. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scabre* extract and isolated constituents. *Letters in Applied Microbiology* **30**, 105-108.

Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C., Dixon, R. A., 2000. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway *Plant Physiol* **122**, 107-116.

Bolwell, G. P., Coulson, V., Rodgers, M. W., Murphy, D. L., Jones, D., 1991. Modulation of the elicitation response in cultured French bean cells and its implication for the mechanism of signal transduction. *Phytochemistry* **30**, 397-405.

Bolwell, G. P., Bozak, K., Zimmerlin, A., 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* **37**, 1491-1506.

Bozak, K. R., Yu, H., Sirevag, R., Christoffersen, R. E., 1990. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. Proc. *Natl. Acad. Sci, USA* **87**, 3904-3908.

Brown, S. A., El-Dakhakhny, M., Steck, W., 1970. Biosynthesis of linear furanocoumarins. *Can J Biochem* **48**, 863-871.

Brown, S. A., 1979. Biosynthetic studies on coumarins. *Planta medica* **36**, 299-310.

Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., Hirt, H., 2000. Differential activation of four specific MAOK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem* **275**, 36734-36740.

Chapple, C., 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev Biochem Plant Mol. Biol* **49**, 311-343.

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

Chen , I.-S., Chang, C.-T., Shenn, W.-S., Teng, C.-M., Tsai, I.-L., Duh, C.-Y., Ko, F.-N., 1996. Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from formasan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* **41**, 525-530.

Chen, J.-S., Berenbaum, M. R., Schuler, M. A., 2002. Amino acids in SRS1 and SRS6 are critical for furanocoumarin metabolism by CYP6B1v1, a cytochrome P450 monooxygenase. *Insect Molecular Biology* **11**, 175-186.

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

Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, A. M. G., van der Heijden, R., Verpoorte, R., Memelink, J., 2001.Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Letters* **508**, 215-220.

Coviella, C., Stipanovic, R. D., Trumble, J. T., 2001. Plant allocation to defensive compounds in elevated atmospheric CO_2 and mechanism of plant resistance to herbivorous insects. *Experimental Botany* **53**, 323-331.

Cupp-Vickery, J. R. und Poulos, T. L., 1995. Structure of $P450_{eryF}$ involved in erythromycin biosynthesis. *Nat Struct Biol* **2**, 144-153.

Degtyarenko, K. N. und Kulikova, T. A., 2001. Evolution of bioinorganic motifs in P450-containing systems. *Biochemical Society Transactions* **29**, 139-146.

Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B., 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-21.

Dercks, W., Trumble, J., Winter, C., 1990. Impact of atmospheric pollution on linear furanocoumarin content in celery. *J Chem Ecol* **16**, 443-454.

De Vetten, N., Horst, T. J., van Schaik, H.-P., De Boer, A., Mol, J., Koes, R., 1999. A cytochrome b_5 is required for full activity of the flavonoid 3`, 5`-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 778-783.

Dhillon, D. S. und Brown, S. A., 1976. Localization, purification, and characterization of dimethylallylpyrophosphate:umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Arch Biochem Biophys* **177**, 74-83.

Diawara, M. M., Trumble, J, T., Quiros, C. F., 1993. Linear furanocoumarins of three celery breeding lines: Implications for integrated pest management. *J Agric Food Chem* **41**, 819-824.

Diawara, M. M., Trumble, J. T., Quiros, C. F., Hansen, R., 1995. Implications of distribution of linear furanocoumarins within celery. *J Agric Food Chem* **43**, 723-727.

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

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

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

Donaldson, R. P. und Luster, D. G., 1991. Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol.* **96**, 669-674.

Douglas, C. J., 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends in Plant Science* **1**, 171-178.

Du, L. und Chen, Z., 2000. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **24**, 837-847.

Durner, J., Shah, J., Klessig, D. F., 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **7**, 266-274.

Durst, F. und Nelson, D. R., 1995. Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metabol Drug Interact* **12**, 189-206.

Durst, F., Benveniste, I., Schalk, M., Werck-Reichhart, D., 1996. Cinnamic acid hydroxylase activity in plant microsomes. *Methods Enzymol* **272**, 259-268.

Duvold, T., Calf, P., Bravo, J.-M., Rohmer, M., 1997. Incorporation of 2-C-methyl-D-erythritol, a putative isoprenoid precursor in the mevalonat-independent pathway, into ubiquinone and menaquinone of *Eschericia coli. Tetrahedron Letters* **38**, 6181-6184.

Eichmann, B. F., Mooers, B. H., Alberti, M., Hearst, J. E., Ho, P. S., 2001. The crystal structures of psoralen cross-linked DNAs: Drug-dependent formation of holliday junctions. *J Mol Biol* **308**, 15-26.

Elgamal, M. H. A., Shalaby, N. M. M., Duddeck, H., Hiegemann, M., 1993. Coumarins and coumarin glucosides from the fruits of *Ammi majus*. *Phytochemistry* **34**, 819-823.

Ellis, B. E. und Amrhein, N., 1971. The „NIH-shift“ during aromatic *ortho*-hydroxylation in higher plants. *Phytochemistry* **10**, 3069-3072.

El Mofty, A. M., 1948. A preliminary report on the treatment of leukoderma with *Ammi majus* Linn. *J R Egypt Med Ass* **31**, 651-665.

El Mofty, A. M., el Sawalhy, H., el Mofty, M., 1994. Clinical study of a new preparation of 8-methoxypsoralen in photochemotherapy. *Int J Dermatol* **8**, 588-592.

El Mofty, M., Zaher, H., Esmat, S., et al., 2001. PUVA and PUVB in vitiligo- are they equally effective? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **17**, 159-163.

Endler, A., Lukačin, R., Wellmann, F., Martens, S., Schreiner, S., Matern, U., 2004. Two functionally expressed members of a 4-coumarate:CoA ligase family from *Ruta graveolens*. In Vorbereitung.

Fahrendorf, T. und Dixon, R.A., 1993. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XVIII: Molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* **305**, 509-515.

Fellbrich, G., Blume, B., Brunner, F., Hirt, H, Kroj, T., Ligterink, W., Romanski, A., Nürnberger, T., 2000. *Phytophthora parasitica* elicitor-induced reactions in cells of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell Physiol* **4**, 692-701.

Fischer, T.C., Klattig, J.T., Gierl, A., 2001. A general cloning strategy for divergent plant cytochrome P450 genes and its application in *Lolium rigidum* and *Ocimum basilicum*. *Theor Appl Genet* **103**, 1014-1021.

Frank, M.R., Deyneka, J.M., Schuler, M.A., 1996. Cloning of wound-induced cytochrome P450 monooxygenases expressed in pea. *Plant Physiol.***110**, 1035-1046.

Franke, K., Porzel, A., Masaoud, M., Adam, G., Schmidt, J., 2001. Furanocoumarins from *Dorstenia gigas*. *Phytochemistry* **56**, 611-621.

Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Chapple, C., 2002a. The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal* **30**, 33-45.

Franke, R., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Humphreys, J. M., Chapple, C., 2002b. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **30**, 47-59.

Fritig, B., Hirth, L., Ourisson, G., 1970. Biosynthesis of the coumarins: Scopoletin formation in tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* **9**, 1963-1975.

Froehlich, J. E., Itoh, A., Howe, G. A., 2001. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology* **125**, 306-317.

Frohmann, M.A., Dush, M. K., Martin, G. R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 8998-9002.

Fujioka, T., Furumi, K., Fujii, H., Okabe, H., Mihashi, K., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., Mori, M., 1999. Antoproliferative constituents from Umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **47**, 96-100.

Fulton, D. C., Kroon, P. A., Matern, U., Threlfall, D. R., Whitehead, I. M., 1993. Inhibition of phytosterol biosynthesis in elicitor-treated cultures of *Ammi majus*. *Phytochemistry* **34**, 139-145.

Gang, D. R., Beuerle, T., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., Pichersky, E., 2002. Differential production of metahydroxylated phenylpropanoids in sweet basil peltate glandular trichomes and leaves is controlled by the activities of specific acyltransferases and hydroxylases. *Plant Physiology* **130**, 1536-1544.

Garfinkel, D., 1958. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* **77**, 493-509.

Gellért, M., Szendrei, K., Novák, J., Csedö, K., Reisch, J., 1972. Furocoumarins from the pericarp of *Evodia hupehensis*. *Phytochemistry* **11**, 2894.

Gestetner, B. und Conn, E. E., 1974. The 2-hydroxylation of trans-cinnamic acid by chloroplasts from *Melilotus alba*. *Arch Biochem Biophys* **243**, 523-529.

Giuliano, G., Bartley, G. E., Scolino P. A., 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* **5**, 379-387.

Gonzalez, F. J. und Nebert, D. W., 1990. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant "warfare", molecular drive, and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* **6**, 182-186.

Gotoh, O., 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analysis of amino acid and coding nucleotide sequences. J *Biol Chem* **267**, 83-90.

Gottlieb, O. R., Da Silva, M. L., Maia, J. G. S., 1972. Distribution of coumarins in amazonian *Brosimum* species. *Phytochemistry* **11**, 3479-3480.

Graham, S. E. und Peterson, J. A., 1999. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch of Biochem Biophy* **369**, 24-29.

Gravot, A., 2002. Dissertation. Etude de P450s impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens*. Departement of Agronomie & Environnement, Institut National Polytechnique de Lorraine, Vandoevre, Frankreich.

Greber, B., Lehrach, H., Himmelbauer, H., 2003. Characterization of trimethylpsoralen as mutagen for mouse embryonic stem cells. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis* **525**, 67-76.

Grisebach, H. und Ollis, W. D., 1961. Biogenetic relationship between coumarins, flavonoids, isoflanvonoids, and retinoids. *Experientia* **17**, 4-12.

Guengerich, F. P., 1991. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* **266**, 10019-10022.

Guengerich, F. P., 2002. Cytochrome P450 enzymes in the generation of commercial products. *Nature Reviews* **1**, 359-366.

Guo, L.-Q., Taniguchi, M., Xiao, Y.-Q., Baba, K., Ohta, T., Yamazoe, Y., 2000. Inhibitory effect of natural furanocoumarins on human microsomal cytochrome P450 3A activity. *Jpn J Pharmacol*. **82**, 122-129.

Hagemeier, J., Batz, O., Schmidt, J., Wray, V., Hahlbrock, K., Strack, D., 1999. Accumulation of phthalides in elicitor-treated cell suspension cultures of *Petroselinum crispum*. *Phytochemistry* **51**, 629-635.

Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. R., Schmelzer, E., 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4150-4157.

Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nürnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I. E., Tan, J., 2003. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interaction. Proc Natl Acad Sci USA eingereicht.

Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P. H., Stocker, R. H., Stenzel, K., 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**, 153-156.

Halkier, B. A., 1997. Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* **43**, 1-21.

Hamerski, D. und Matern, U., 1988a. Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in *Ammi majus* L. suspension cultures. *Eur J Biochem* **171**, 369-375.

Hamerski, D. und Matern, U., 1988b. Biosynthesis of psoralens. Psoralen 5-monooxygenase activity from elicitor-treated *Ammi majus* cells. *FEBS Letters* **239**, 263-265.

Hamerski, D., Beier, R.C., Kneusel, R.E., Matern, U., Himmelspach, K., 1990. Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension cultures of *Ammi majus*. *Phytochemistry* **29**, 1137-1142.

Harborne, J. B. und Williams, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.

Hasemann, C. A., Ravichandran, K. G., Peterson, J. A., Deisenhofer, J., 1994. Crystal structure and refinement of cytochrome $P450_{terp}$ at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* **236**, 1169-1185.

Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A., Deisenhofer, J., 1995. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **3**, 41-62.

Hauffe, K. D., 1988. Induktion von O-Methyltransferasen der Furanocumarinbiosynthese in *Petroselinum crispum* L. Dissertation, Universität Köln.

Haudenschild, C. und Hartmann, M.-A., 1995. Inhibition of sterol biosynthesis during elicitor-induced accumulation of furanocoumarins in parsley cell suspension cultures. *Phytochemistry* **40**, 1117-1124.

Hehmann, M., Lukačin, R., Ekiert, H., Matern, U., 2003. Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L.. Cloning og bergaptol-*O*-methyltransferase. *Eur J Biochem*, eingereicht.

Helliwell, C. A., Sullivan, J. A., Mould, R. M., Gray, J. C., Peacock, W. J., Dennis, E. S., 2001. A plastid envelope location of *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmatic reticulum steps of the gibberelin biosynthesis pathway. *Plant J* **28**, 201-208.

Hemm, M. R., Herrmann, K. M., Chapple, C., 2001. AtMYB4: a transcription factor in the battle against UV. *Trends Plant Sci* **6**, 135-136.

Hermann, G., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Wenk, J., Faisst, K., Quel, G., Hommel, C., Goerz, G., Ruzicka, T., Krieg, T., Sies, H., Schaeffetter-Kochanek, K., 1998. Psoralen photoactivation promotes morphological and functional changes in fibroblasts *in vitro* reminiscent of cellular senescence. *J Cell Sci* **11**, 759- 767.

Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., Legrand, M., 2003. Purification, Cloning, and Properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **278**, 95-103.

Hotze, M., Schröder, G., Schröder, J., 1995. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P_{450} proteins as translational fusions with P_{450} reductase in *Echerichia coli*. *FEBS Lett.* **374**, 345-350.

Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Chapple, C., 1999. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis* a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase catalyzing parallel hydroxylations in phenylpropanoid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10045-10050.

Hung, C.-F., Berenbaum, M. R., Schuler, M. A., 1997. Isolation and characterization of CYP6B4, a furanocoumarin-inducible cytochrome P450 from polyphagous caterpillar (Lepidoptera: *Papilionidae*). *Insect Biochem Mol Biol* **27**, 377-385.

Huong, D. T., Choi, H. C., Rho, T. C., Lee, H. S., Lee, M. K., Kim, Y. H., 1999. Inhibitory acvtivity of monoamine oxidase by coumarin from *Peucedanum japonicum*. *Arch Pharm Res* **22**, 324-326.

Innocenti, G., Dall'Acqua, F., Caporale, G., 1976. Investigations of the content of furocoumarins in *Apium graveolens* and in *Petroselinum sativum*. *Planta medica* **29**, 167-170.

Ivie, G. W., 1978. Linear furocoumarins (psoralens) from the seed of Texas *Ammi majus* L. (Bishop's Weed). *J Agric Food Chem* **26**, 1394-1402.

Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahbrock, K., Scheel, D., 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4800-4805.

Jefcoate, C. R., 1978. Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Meth Enzymol* **52**, 258-279.

Jennewein, S., Rithner, C. D., Williams, R. M., Croteau, R. B., 2001. Taxol biosynthesis: Taxane 13α-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13595-13600.

Jennewein, S., Rithner, C. D., Williams, R. M., Croteau, R., 2003. Taxois metabolism: Taxoid 14beta-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Arch Biochem Biophys* **413**, 262-270.

Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., Martin, C., 2000. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **19**, 6150-6161.

Kahn, R. A., Bak, S., Olsen, C. E., Svendesen, I., Møller, B. L., 1996. Isolation and reconstitution of the heme-thiolate protein obtusifoliol 14 alpha-demethylase from *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J Biol Chem* **271**, 32944-32950.

Kahn, R. A. und Durst, F., 2000. Function and evolution of plant cytochrome P450. 151-177. In: Romeo, J. T., Ibrahim, R., Varin, L., De Luca, V. Recent Advances in Phytochemistry.Volume 34. Evolution of Metabolic Pathways. Elsevier Science Pergamon.

Kareiva, P., 1999. Coevolutionary arms races: Is victory possible? *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8-10.

Kato, H., Kodama, O., Akatsuka, T., 1994. Characterization of an inducible P450 hydroxylase involved in the rice diterpene phytoalexin biosynthetic pathway. *Arch Biochem Biophys* **316**, 707-712.

Kauss, H., Franke, R., Krause, K., Conrath, U., Jeblick, W., Grimmig, B., Matern, U., 1993. Conditioning of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cultures increases elicitor-induced incorporation of cell wall phenolics. *Plant Physiol* **102**, 459-466.

Kiistala, R., Mäkinen-Kiljunen, S., Heikkinen, K., Rinne, J., Haahtela, T., 1999. Occupational allergic rhinitis and contact urticaria caused by bishop`s weed (*Ammi majus*). *Allergy* **54**, 635-639.

Kim, D. K., Lim, J. H., Eom, D. O., Eun, J. S., Leem, K. H., 2002. Acetalcholinersterase inhibitors from the roots of *Angelica dahurica*. *Arch Pharm Res* **25**, 856-859.

Kitamura, Y., Ikenaga, T., Ooe, Y., Hiraoka, N., Mizukami, H., 1998. Induction of furanocoumarin biosynthesis in *Ghlenia littiralis* cell suspension cultures by elicitor treatment. *Phytochemistry* **48**, 113-117.

Klingenberg, M., 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75**, 376-386.

Kneusel, R.E., Matern, U., Nicolay, K., 1989. Formation of *trans*-caffeoyl-CoA from *trans*-4-coumaroyl-CoA by Zn^{2+}-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Arch Biochem Biophys* **269**, 455-462.

Koenigs, L. L. und Trager, W. F., 1998a. Mechanism-based inactivation of P450 2A6 by furanocoumarins. *Biochemistry* **37**, 10047-10061.

Koenigs, L. L. und Trager, W. F., 1998b. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 8-methoxypsoralen and several other furanocoumarins. *Biochemistry* **37**, 13184-13193.

Koenigs, L. L., Peter, R. M., Thompson, S. J., Rettie, A. E., Trager, W. F., 1997. Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen. *Drug Metabolism and Disposition* **25**, 1407-1415.

Koopmann, E. und Hahlbrock, K., 1997. Differentially regulated NADPH:cytochrome P450 oxidoreductases in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14954-14959.

Koopmann, E., Logemann, E., Hahlbrock, K., 1999. Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. *Plant Physiol*.**119**, 49-55.

Kozak, M., 1989. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**, 229-241.

Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C. et al., 1998. Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 263-276.

Kroj, T., 1999. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen – neue Signalelemente in der pflanzlichen Pathogenabwehr. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Kühnle, T., Koch, U., Heller, W., Wellmann, E., 1987. Chlorogenic acid biosynthesis: characterization of a light-induced microsomal 5-O-(-4-coumaroyl)-D-quinate/shikimate 3`-hydroxylase from carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys* **258**, 226-232.

Lamb, C. J., 1979. Regulation of enzyme levels in phenylpropanoid biosynthesis: charcterisation of the modulation by light and pathway intermediates. *Arch Biochem Biophys* **192**, 311-317.

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

Lee, C. A., Kost, T. A., Serabjit-Singh, C. J., 1996. Recombinant baculovirus strategy for coexpression of functional human cytochrome P450 and P450 reductase. *Methods in Enzymology* **272**, 86-95.

Lei, T. C., Virador, V., Yasumoto, K., Vieira, W. D., Toyofuku, K., Hearing, V. J., 2002. Stimulation of melanoblast pigmentation by 8-methoxypsoralen: the involvement of microphthalmia-associated transcription factor, the protein kinase. A pathway, and proteosome-mediated degradation. *The Journal of Investigative Dermatology* **119**, 1341-1349.

Léon, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M. A., Raskin, I., 1995. Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1043-1047.

Léon, J., Yalpani, N., Raskin, I., Lawton, M. A., 1993. Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol* **103**, 323-328.

Lesot, A., Hasenfratz, M. P., Batard, Y., Durst, F., Benveniste, I., 1995. Two messenger-RNAs for NADPH-cytochrome P450 reductase in *Helianthus tuberosus* tuber tissue. *Plant Physiol Biochem* **33**, 751-757.

Leyva, A., Liang, X. W., Pintortoro, J. A., Dixon, R. A., Lamb, C. J., 1992. Cis-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* **4**, 263-271.

Li, X., Berenbaum, M. R., Schuler, M. A., 2000. Molecular cloning and expression of CYP6B8: a xanthotoxin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 75-84.

Li, W., Petersen, A., Schuler, M. A., Berenbaum M. R., 2002. CYP6B cytochrome P450 monooxygenases from *Papilio canadensis* and *Papilio glaucus*: potential contributions of sequence divergence to host plant associations. *Insect Molecular Biology* **11**, 543-551.

Li, W., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R., 2003. Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. *Proc Natl Acad Sci USA* .

Liang, P., Pardee, A., 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNAs by means of polymerase chain reaction. *Science* **276**, 2054-2057.

Liang, P., Averboukh, L., Pardee, A., 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research* **21**, 3269-3275.

Lindbergh, R. L. und Negeshi, M., 1989. Alteration of mouse cytochrome P450coh substrate specifity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature* **339**, 632-634.

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

Ljunggren, B., 1990. Severe phototoxic burn following celery ingestion. *Arch Dermatol* **126**, 1334-1336.

Logemann, E., Parniske, M., Hahlbrock, K., 1995. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia–lyase family in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5905-5909.

Lohman, D. J. und McConnaughay, K. D., 1998. Patterns of defensive chemical production in wild parsnip seedlings (Apiaceae: *Pastinaca sativa*). *Chemoecology* **8**, 195-200.

Lutterbüse, R., 1995. Frühmetastasierung epithelialer Tumore: Vergleichende Analyse der Genexpression primärer und mikrometastatischer Tumorzellen mittels mRNA-Differential Display Technik. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.

Ma, R., Cohen, M. B., Berenbaum, M. R., Schuler, M. A., 1994. Black swallowtail (*Papilio plyxenes*) alleles encode cytochrome P-450s that selectively metabolize linear furanocoumarins. *Arch Biochem Biophys* **310**, 332-340.

Mansuy, D., Battioni, J. P., Chottard, J. C., Ullrich, V., 1993. Preparation of a porphyrin-iron-carbene model for the cytochrome P450 complexes obtained upon metabolic oxidation of insecticide synergist of the 1,3-benzodioxole series. *J Am Chem Soc* **101**, 3971-3973.

Mariano, T. M., Vetrano, A. M., Gentile, S. L., Heck, D. E., Whittemore, M. S., Guillon, C. D., Jabin, I., Rapp, R. D., Heindel, N. D., Laskin, J .D., 2002. Cell-impermanent pyridinium derivatives of psoralens as inhibitors of keratinocyte growth. *Biochemical Pharmacology* **63**, 31-39.

Martin-Facklam, M., Drewe, M. J., Haefeli, W. E., 2000. Arzneimittel-Interaktionen am Cytochrom-P450-System. *Dtsch med Wschr* **125**, 63-67.

Martens, S. und Forkmann, G., 1999. Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* Hybrids. *The Plant Journal* **20**, 611-618.

Martin, R. und Reichling, J., 1992. NIH-Shift during biosynthesis of epoxy-pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrate) in tissue cultures of *Pimpinella anisum*. *Phytochemistry* **31**, 511-514.

Matern, U., 1991. Coumarins and other phenylpropanoid compounds in the defense response of plant cells. *Planta medica* **57**, S15.

Matern, U., Lüer, P., Kreusch, D., 1999. Biosynthesis of coumarins. In: Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Sankawa, U. (eds.) Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1, Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives. Elsevier Science Ltd., Oxford, UK, pp. 623-637.

Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T., Kajiwara,T., 1997. Bell pepper fruit acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Letters 394*, 21-24.

Matsuno, M., Nagatsu, A., Ogihara, Y., Ellis, B. E., Mizukami, H., 2002. CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4`-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis. *FEBS Letters* **514**, 219-224.

Meier, A. H., De Waal, A., Verpoorte, R., 1993. Purification of the cytochrome P-450 enzyme geraniol 10-hydroxylase from cell cultures of *Catharanthus roseus*. *J Chromatogr* **635**, 237-249.

Meijer, A. H., Lopes Cardoso, M. I., Voskuilen, J. T., De Waal, A., Verpoorte, R., Hoge, J. H., 1993. Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH:cytochrome P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenasese in plants. *Plant J* **4**, 47-60.

Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J. A., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmidt, E., Blum, W., Inverardi, B., 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004-1006.

Métraux, J.-P., 2002. Recent breakthrough in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science* **7**, 332-334.

Meyer, K., Cusumano, J. C., Sommerville, C., Chapple, C. C. S., 1996. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of ctochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6869-6874.

Mizutani, M., Ward, E., DiMaio, J., Ohta, D., Ryals, J., Sato, R., 1993. Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding mung bean cytochrome P450 (P450C4H) possessing cinnamate 4-hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **190**, 875-880.

Mizutani, M., Ohta, D., Sato, R., 1997. Isolation of cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. *Plant Physiol* **113**, 755-763.

Mizutani, M. und Ohta, D., 1998. Two isoforms of NADPH:cytochrome P450 reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**, 357-367.

Moehs, C. P., Allen, P. V., Friedman, M. F., Belknap, W. R., 1997. Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *The Plant Journal* **11**, 227-236.

Monteiro, De F. F. V., Mathias, L., Vieira, I. J. C., Schripsema, J., Braz-Filho, R., 2002. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosiumum gaudichaudii*. *J Braz Chem Soc* **13**, 281-287.

Moyano E., Martinez-Garcia, J. F., Martin, C., 1996. Apparent redundancy in *myb* gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Antirrhinum* flowers. *Plant Cell* **8**, 1519-1532.

Murray , R. D. H., Méndez, J., Brown, S.A., 1982. The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry, Wiley, New York.

Musajo, L. und Rodighiero, G., 1962. The skin-photosensitizing furocoumarins. *Experientia* **18**, 153.

Nasser, A. und Singab, B., 1998. Acetylated flavonol triglycosides from *Ammi majus* L. *Phytochemistry* **49**, 2177-2180.

NDong, C., Anzellotti, D., Ibrahim, R. K., Huner, N. P., Sarhan, F., 2003. Daphnetin methylation by a novel *O*-methyltransferase is associated with cold acclimation and photosystem II excitation pressure in rye. *J Biol Chem* **278**, 6854-6861.

Nedelkina, S., Jupe, S. C., Blee, K. A., Schalk, M., Werck-Reichhart, D., Bolwell, G. P., 1999. Novel characteristics and regulation of a divergent cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A15) from French bean: engineering expression in yeast. *Plant Molecular Biology* **39**, 1079-1090.

Nelson, D. R. und Strobel, H. W., 1987. Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol Biol Evol* **4**, 572-593.

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W., 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.

Nelson, D. R., 1998. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **121**, 15-22.

Nelson, D. R., 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**, 1-10.

Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E.F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R., Waxman, D. J., Nebert, D. W., 1993. The P450 superfamily: update on new sequneces, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*. **12**, 1-51.

Nigg , H. N., Strandberg, J. O., Beier, R. C., Petersen, H. D., Harrison, J. M., 1997. Furanocoumarins in florida celery varieties increased by fungicide treatment. *J Agric Food Chem* **45**, 1430-1436.

Nitao, J. K., Berhow, M., Duval, S. M., Weisleder, D., Vaughn, S. F., Zangerl, A., Berenbaum, M. R., 2003. Characterization of furanocoumarin metabolites in parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*. *J Chem Ecol* **29**, 671-682.

Ober, D. und Hartmann, T., 2000. Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolozidine alkaloids. *Plant Molecular Biology* **44**, 445-450.

O'Keefe, D. P., Leto, K. J., 1989. Cytochrome P-450 from the mesokarp of avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol* **89**, 1141-1149.

Ojala T., 2001. Biological Screening of Plant Coumarins. Dissertation, Universität Helsinki.

Omura, T., 1999. Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophysl Res Commun* **266**, 690-698.

Omura, T. und Sato, R., 1964. The carbon monoxide–binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **239**, 2370-2378.

Omura, T. und Sato, R., 1964. The carbon monoxide–binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem* **239**, 2379-2385.

Osawa, Y. und Pohl, L. R., 1989. Covalent bonding of the prosthetic heme to protein: a potential mechanism fort the suicide inactivation or activation of hemeproteins. *Chemical Research in Toxiciology* **2**, 131-141.

Pae, H. O., Oh, H., Yun, Y. G., Oh, G. S., Jang, S. I., Hwang, K. M., Kwon, T. O., Lee, H. S., Chung, H. T., 2002. Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 Cells. *Pharmacol Toxicol* **91**, 40-48.

Paquette, S. M., Bak, S., Feyereisen, R., 2000. Intron-exon organizytion and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol* **19**, 307-317.

Pathak, M. A., Daniels, F., Fitzpatrick, T. B., 1962. The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *J Invest Dermatol* **39**, 225-239.

Pathak, M. A. und Fitzpatrick, T. B., 1992. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J Photochem Photobiol B*. **141**, 3-22.

Paxton, J. A., 1980. A new working definition of the term "phytoalexin". *Plant Dis* **64**, 734.

Pellegrini, L., Rohfritsch, O., Fritig, B., Legrand, M., 1994. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction in tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Phys* **106**, 877-886.

Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., Fischhoff, D. A., 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA 88*, 3324-3328.

Perrin, D. R. und Bottomley, W., 1961. Pisatin: an antifungal substance from *Pisum sativum* L. *Nature* **191**, 76-77.

Peterson, D. H., 1952. Microbial transformation of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 og progesterone. *J Am Chem Soc* **74**, 5933-5936.

Pierrel, M. A., Batard, Y., Kazmaier, M., Mignotte-Vieux, C., Durst, F., Werck-Reichhart, D., 1994. Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast. Substrate specificity of a cinnamate hydroxylase. *Eur J Biochem* **224**, 835-844.

Pieterse, C. M. J. und van Loon, L. C., 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Pant Sci* **4**, 52-57.

Pompon, D., Louerat, B., Bronne, A., Urban, B., 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology* **272**, 51-64.

Poulos, T. L., Finzel, B. C., Howard, A. J., 1987. High-resolution crystal structure of cytochrome P-450_{cam}. *J Mol Biol* **195**, 687-700.

Qutob, D., Huitema, E., Gijzen, M., Kamoun, S., 2003. Variation in structure and activity among elicitins from *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 119-124.

Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A., Deisenhofer, J., 1993. Crystal structure of hemoprotein domain of $P450_{BM-3}$ a prototype for microsomal P450s. *Science* **261**, 731-736.

Ro, D.-K., Mah, N., Ellis, B. E., Douglas, C. J., 2001. Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology* **126**, 317-329.

Ro, D.-K., Ehlting, J., Douglas, C. J., 2002. Cloning, functional expression, and subcellular localization of multiple NADPH-cytochrome P450 Reductases from hybrid poplar. *Plant Physiology* **130**, 1837-1851.

Röther, D., Merkel, D., Rétey, J., 2000. Spectroscopic evidence for a 4-methylidene imidazol-5-one in Histidine and phenylalanine ammonia lyase. *Angew Chem Int Ed* **39**, 2462-2463.

Röther, D., Poppe, L., Morlock,G., Viergutz, S., Rétey, J., 2002. An active site homology model of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum*. *Eur J Biochem* **269**, 3065-3075.

Rosco, A., Pauli, H. H., Priesner, W., Kutchan, T. M., 1997. Cloning and heterologous expression of NADPH-cytochrome P450 reductases from Papaveraceae. *Arch Biochem Biophys* **348**, 369-377.

Rouwendal, G. J. A., Mendes, O., Wolbert, E. J. H., Douwe de Boer, A., 1997. Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. *Plant Molecular Biology* **33**, 989-999.

Rupasinghe, S., Baudry, J., Schuler, M. A., 2003. Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modeling. *Protein Engineering* **16**, 721-731.

Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I. E., 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* **15**, 5690-5700.

Russell, D. W., 1971. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X.Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. *J Biol Chem* **246**, 3870-3878.

Rustérucci, C., Stallaert, V., Milat, M. L., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.-P., 1996. Relationship between reactive oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitins in *Nicotiana*. *Plant Physiol* **111**, 885-891.

Ryals, J., Lawton, K. A., Terrence, P. D., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B., Weymann, K., 1995. Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4202-4205.

Schalk, M., Batard, Y., Seyer, A., Nedelkina, S., Durst, F., Werck-Reichhart, D., 1997. Design of fluorescent substrates and potent inhibitors of CYP73As, P450s that catalyze 4-hydroxylation of cinnamic acid in higher plants. *Biochemistry* **36**, 15253-15261.

Schalk, M., Cabello-Hurtado, F., Pierrel, M.-A., Atanossova, R., Saindrenan, P., Werck-Reichhart, D., 1998. Piperonylic acid, a selective, mechanism-based inactivator of the *trans*-cinnamate 4-hydroxylase: A new tool to control the flux of metaboltites in the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol* **119**, 209-218.

Schalk, M., Nedelkina, S., Schoch, G., Batard, Y., Werck-Reichhart, D., 1999. Role of unusual amino acid residues in the proximal and distal heme regions of a plant P450, CYP73A1. *Biochemistry* **38**, 6093-6103.

Schlatter, J., Zimmerli, B., Dick, R., Panizzon, R., Schlatter, C., 1991. Dietary intake and risk assessment of phototoxic furanocoumarins in humans. *Food Chem Toxicol* **29**, 523-530.

Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3`-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem* **276**, 36566-36574.

Schoch, G. A., Nikov, G. N., Alworth, W. L., Werck-Reichhart, D., 2002. Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid in elicited cells. *Plant Physiol* **130**, 1022-1031.

Schoch, G. A., Attias, R., Le Ret, M., Werck-Reichhart, D., 2003. Key substrate recognition residues in the active site of a plant cytochrome P450, CYP73A1. *Eur J Biochem* **270**, 3684-3695.

Schopfer, C. R. und Ebel, J., 1998. Identification of elicitor-induced cytochrome P450 of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. *Mol Gen Genet* **258**, 315-322.

Schröder, G., Unterbusch, E., Kaltenbach, M., Schmidt, J., Strack, D., De Luca, V., Schröder, J., 1999. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Lett* **458**, 97-102.

Schuler, M. A. und Werck-Reichhart, D., 2003. Functional Genomics of P450s. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 629-667.

Schwab, M., Marx, C., Zanger, U. M., Eichelbaum, M., 2002. Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme. *Deutsches Ärzteblatt* **99**, A497-504.

Schwede, T. F., Rétey, J., Schulz, G. E., 1999. Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry* **38**, 5355-5361.

Scott, J. G., Liu, N., Wen, Z., 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **121**, 147-155.

Scott, J. G., Foroozesh, M., Hopkins, N. E., Alefantis, T. G., Alworth, W. L., 2000. Inhibition of cytochrome P450 6D1 by alkynylarenes, methylenedioxyarenes, and other substituted aromatics. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **67**, 63-71.

Serizawa, N. *et al.*, 1983. Microbial hydroxylation of ML-236B (compactin) and monacolin K (MB-530B). *J Antibiot (Tokyo)* **36**, 604-607.

Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C., Dixon, R. A., 1997. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology* **115**, 41-50.

Sharp, J. K., Valent, B., Albersheim, P., 1984. Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J Biol Chem* **259**, 11312-11320.

Shen, A. L. und Kasper, C. B., 1995. Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *J Biol Chem* **270**, 27475-27480.

Shet, M. S., Sathasivan, K., Arlotto, M. A., Mehdy, M. C., Estabrook, R. W., 1993. Purification, characterization, and cDNA cloning of an NADPH-cytochrome P450 reductase from mung bean. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2890-2894.

Siminszky, B., Corbin, F. T., Ward, E. R., Fleischmann, T. J., Dewey, R. E., 1999. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 1750-1755.

Siritunga, D. und Sayre, R.T., 2003. Generation of cyanogen-free transgenic cassava. *Planta* **217**, 367-373.

Sligar, S. G., 1976. Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450. *Biochemistry* **15**, 5399-5406.

Smith, C. G., Rodgers, M. W., Zimmerlin, A., Ferdinando, D., Bolwell, P., 1994. Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Planta* **192**, 155-164.

Song, W.-C., Funk, C. D., Brash, A. R., 1993. Molecular cloning of an allene oxide synthase: A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8519-8523.

Spielmann, H. P., Dwyer, T. J., Sastry, S. S., Hearst, J. E., Wemmer, D. E., 1995. DNA structural reorganization upon conversion of a psoralen furan-side monoadduct to an interstrand cross-link: Implication for DNA repair. *Proc Natl Acad Sci* USA **92**, 2345-2349.

Springob, K., Lukačin, R., Ernwein, C., Gröning, I., Matern, U., 2000. Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*. *Eur J Biochem* **267**, 6552-6559.

Stanjek, V., Miksch, M., Boland, W., 1997. Stereoselective syntheses of deuterium labelled marmesins; valuable metabolic probes for mechansitic studies in furanocoumarin biosynthesis. *Tetrahedron* **53**, 17699-17710.

Stanjek, V. und Boland, W., 1998. Biosynthesis of angular furanocoumarins: mechanism and stereochemistry of the oxidative dealkylation of columbianetin to angelicin in *Heracleum mantegazzianum* (Apiaceae). *Helvetica Chimica Acta* **8**, 1596-1607.

Stanjek, V., Piel, J., Boland, W., 1999. Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae). *Phytocheimstry* **50**, 1141-1145.

Stanjek, V., Miksch, M., Lueer, P., Matern, U., Boland, W., 1999. Biosynthese des Psoralens: zum Mechansimus einer Cytochrom P450-katalysierten, oxidativen Bindungsspaltung. *Angew* **Chem** 111, 413-415.

Stevens, J. L., Snyder, M. J., Koener, J. F., Feyereisen, F., 2000. Inducible P450s of the CYP9 family from larval *Manduca sexta* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 559-568.

Stevenson, P. C., Simmonds, M. S. J., Yule, M. A., Veitch, N. C., Kite, G. C., Irwin, D., Legg, M., 2003. Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium daniellii*. *Phytochemistry*, **63**, 41-46.

Tada, Y., Shikishima, Y., Takaishi,Y., Shibata,H., Higuti, T., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., Ashurmetov, O., Ohmoto, Y., 2002. Coumarins and γ-pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* **59**, 649-654.

Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F. A., Roberts, K., Martin, C., 1998. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulates phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* **10**, 135-154.

Tanaka, M. und Kojima, M., 1991. Purification and characterization of *p*-coumaroyl-D-glucose hydroxylase of sweet potato (*Ipomea batatus*) roots. *Arch Biochem Biophys* **284**, 151-157.

Teutsch, H. G., Hasenfratz, M. P., Lesot, A., Stoltz, K., Garnier, J.-M., Jeltsch, J.-M., Durst, F., Werck-Reichhart, D., 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 4102-4106.

Thomma, B., Penninckx, I., Broekaert, W., Cammue, B., 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* **13**, 63-68.

Tietjen, K. G., Hunkler, D., Matern, U., 1983a. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 1. Identification of induced products as coumarin derivatives. *Eur J Biochem* **131**, 401-407.

Tietjen, K. G. und Matern, U., 1983b. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 2. Effects on enzyme activities. *Eur J Biochem* **131**, 409-413.

Truan, G., Cullin, C., Reisdorf, P., Urban, P., Pompon, D., 1993. Enhanced *in vivo* monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b_5. *Gene* **125**, 49-55.

Urban, P., Cullin, C., Pompon, D., 1990. Maximizing the expression of mammalian cytochrome P-450 monooxygnease activities in yeast cells. *Biochimie* **72**, 463-472.

Urban, P., Werck-Reichhart, D., Teutsch, H. G., Durst, F., Regnier, S., Kazmaier, M., Pompon, D., 1994. Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast: kinetic and spectral properties of the major plant P450 of the phenylpropanoid pathway. Eur J Biochem **222**, 843-850.

Urban, P., Truan, G., Bellamine, A., Laina, R., Gautier, J. C., Pompon, D., 1994b. Engineered yeast stimulating P450-dependent metabolism: tricks, myths and reality. Drug Metabolism and Drug Interactions Vol. 11(3) (Hrsg. N. Kingsley). Freund Publishing House, England, 169-200.

Urban, P., Mignotte, C., Kazmeier, M., Delorme, F., Pompon, D., 1997. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J Biol Chem* **272**, 19176-19186.

Vennekamp, J., 2002. Synthese und elektrophysiologische Testung hochwirksamer Psoralenderivate als nicht-peptidische Blocker des lymphozytären Kaliumkanals Kv1.3. Dissertation, Christian-Albrechst-Universität.

Vetter, H.-P., Mangold, U., Schröder, G., Marner, F.-J., Werck-Reichhart, D., Schröder, J., 1992. Molecular analysis ans heterologous expression of an induciblen cytochrome P-450 protein from periwinkle (*Catharanthus roseus* L.). *Plant Physiol* **100**, 998-1007.

Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. S., Kim, J.-J. P., 1997.

Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 8411-8416.

Wanner, L. A., Li, G., Ware, D., Somssich, I. E., Davis, K. R., 1995. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **27**, 327- 338.

Watson, C. J., Froehlich, J. E., Joseffson, C. A., Chapple, C., Durst, F., Benveniste, I., Coolbaugh, R. C., 2001. Localization of CYP86B1 in the outer envelope of chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **42**, 873-878.

Wen, Z., Pan, L., Berenbaum, M. R., Schuler, M. A., 2003. Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 937-947.

Wendorf, H. und Matern, U., 1986. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. Microsomal conversion of (+)-marmesin. *Eur J Biochem* **161**, 391-398.

Werck-Reichhart, D., 1995. Cytochromes P450 in the phenylpropanoid metabolism. *Drug Metab Drug Interact* 12, 221-243.

Werck-Reichhart, D. und Feyereisen, R., 2000. Cytochrome P450: a success story. *Genome Biology* **1**, 3003.1-3003.9.

Werck-Reichhart, D., Hehn, A., Didierjean, L., 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci* **5**, 116-123.

Werck-Reichhart, D., Bark, S., Paquette, S., 2002. Cytochrome P450. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists.

Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., McRee, D. E., 2000. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* **5**, 121-131.

Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinkovic, D., Jhoti, H., 2003. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424**, 464-8.

Whitbred, J. M. und Schuler, M. S., 2000. Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiology* **124**, 47-58.

Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. A., Raskin, I., 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculyted tobacco. *Plant Physiology* **103**, 315-321.

Yang, Y. und Klessig, D. F., 1996. Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible *myb* oncogene homolog from tobacco. *Proc Nat Acad Sci USA* **93**, 14972-14977.

Yang, S., Swwetman, J. P., Amirsadeghi, S., Barghchi, M., Huttly, A. K., Chung, W.-I., Twell, D., 2001. Novel anther-specific *myb* genes from tobacco as putative regulators of phenylalanine ammonia-lyase expression. *Plant Physiology* **126**, 1738-1753.

Yamamura, Y., Ogihara, Y., Mizukami, H., 2001. Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon*: cDNA cloning and gene expression. *Plant Cell Reports* **20**, 655-662.

Yazaki, K., Kunihisa, M., Fujisaki, T., Sato, F., 2002. Geranyl Diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. *J Biol Chem* **277**, 6240-6246.

Zobel, A. M. und March, R. E., 1993. Autofluorescence reveals different histological localizations of furanocoumarins in fruit of some Umbelliferae and Leguminosae. *Annals of Botany* **71**, 251-255.

7. Anhang

7.1 Übersicht der verwendeten Primer

a) Allgemeine Primer

Name	Nukleotidsequenz
Oligo A	5'-TTTTTTTTTTTTMA-3'
Oligo C	5'-TTTTTTTTTTTTMC-3'
Oligo G	5'-TTTTTTTTTTTTMG-3'
Decamer 1	5'-CGCCATTTGG-3'
Decamer 2	5'-CGCCATTCGG-3'
Decamer 3	5'-CGCCCTTTGG-3'
Decamer 4	5'-CGCCCTTCGG-3'
Decamer 5	5'-CGCCGTTTGG-3'
Decamer 6	5'-CGCCGTTCGG-3'
Decamer 7	5'-CGCCTTTTGG-3'
Decamer 8	5'-CGCCTTTCGG-3'
PERF 1	5'-GCGGATCCGA(AG)GA(AG)TT(CT)(AC)G(AGCT)CC(AGCT)GAGAG-3'
PERF 2	5'-GCGGATCCGA(AG)GA(AG)TT(CT)(AC)G(AGCT)CC(AGCT)GAGCG-3'
PERF 3	5'-GCGGATCCGA(AG)GA(AG)TT(CT)(AC)G(AGCT)CC(AGCT)GAAAG-3'
PERF 4	5'-GCGGATCCGA(AG)GA(AG)TT(CT)(AC)G(AGCT)CC(AGCT)GAACG-3'
CypA	5'-(AG) (AC) 5 T (AT) (CT) 555 CC5 (AG) (AT) (AG) AG (AG) TT-3'
CypB	5`-(ACT) T5 (GC) C5 TT (CT) (AG) G5 555 GG5 (AC) (GC) 5 (AC) G-3`
AAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'
AP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
Oligo(dT)	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT(AGC)(AGCT)-3'

b) Primer für die CYP73A41

C4HGSP1	5'-ATTCGGAGTCGGGAGGAGAAGC-3'
C4HGSP2	5'-TTCTCCTCCCGAACTCCGAATGG-3'
C4HGSP3	5'-CGATACCCAGGATAGGCAATGC-3'
C4HGSP4	5'-CCACCCAAATCGATACTGCTGC-3'
C4Hvoll3Ende	5'-GGTATAATGGTATCAAGTCCACC-3'
C4Hvoll5Ende	5`-CCTTCATTCTCCTATTCTCATCC-3`
C4HEx5ENDE	5'-ACATGATGGACTTTGTTCTGTTAGAG-3'
GeneracerC4H1	5'-CCATTGGTAGCAGCCTCAGGATTGG-3'
GeneracerC4H2	5'-GCAGCCTCATCCTCCCACCCAAATCG-3'

c) Primer für CYP71AJ1

P3D39GSP1	5`-GGATATGACTGCTGCCAGTGG-3`
GENERACERMENT1	5`-GTAATGCCACTGGCAGCAGTCATATCC-3`
GENERACERMENT2	5`-CTTCCAATCTTTTCCCTCAGGCAATTCG-3`
Mentvoll3	5`-GAGCTGGGAATGAGTATTGACATGG-3`
Mentvoll5	5`-GCAGAGTGCAGAGCAATAGAAATGAAGATGC-3`
MentEx5Ende	5`-GAAATGAAGATGCTGGAACAGAATCC-3`
BamHraus	5`-CAT CAT AAT ACT ACT GGC TCA AAA TAC AAT GAC TTT GTA TCC-3`

d) Primer für CYP98A21

P4D51GSP1	5'-GGCACAAATTAGGGATCAGCTTGG-3'
P4D51GSP2	5'-CCAAGCTGATCCCTAATTGTGCC-3'
P4D51GSP3	5'-GCAACCTCGGTGTTGGAACAGC-3'
GENERACERCUMAR1	5'-CATGAGTAGTGGTGCAAGAGATGACC-3'
GENERACERCUMAR2	5'-GGAAACTCTTCTTCCAGCTCCGAATGG-3'
Cumarvoll3	5'-CTGTAACCAGGTTCAAGTGG-3'
Cumarvoll5	5'-GTCTTGTAACATGGCTCTCTTCC-3'
CumarEx5Ende	5'-ACATGGCTCTCTTCCTCTACCTG-3'

e) Primer für CYP76B8

P3D59GSP1	5'-CGTTTGGTGCAGGAATAAGG-3'
P3D59GSP2	5'-GGAACCCAACATAACTGGCACC-3'
P3D59GSP3	5'-GGAATCCCACTTTCAAGTTCC-3'
Ger3EX	5'-TTCGTACACAACGTCAACAACC-3'
Ger5Ex	5'-AGATGGATGTGATTATCATTG-3'

f) Primer für CYP82H1

P3D38rGSP1	5'-GGTCCTCCACTTGACACTTGC-3'
P3D38rGSP2	5'-GCAAGTGTCAAGTGGAGGACC-3'
P3D38rGSP3	5'-GCATCGCGAATGTGATACCAGG-3'
5.Seq3Ex	5'-GATACAAAGGATCATATTTGCACC-3'
5.Seq5Ex	5'-AAATGATTACGTGTGAAATGG-3'

g) Primer für die CPR

CPR1	5'-GA(GA)CCIACIGA(CT)AA(CT)GCIGC-3'
CPR2	5'-TC(AG)AA(ACT)TCIA(GA)(GA)TG(TGA)(GA)T(GA)CA-3'
CPR3.3	5'-CTGGCCATGCCTTTGGCATCACC-3'
CPR5.4	5'-CTTGCATATGAAACTGGTGACC-3'
CPR3RACE	5'-CAATCCAACTTCAAGCTTCCTTCTGATACG-3'
CPR5RACE	5'-CAGTGCACTTCTCACAGTGCATGG-3'
CPR3EX	5'-CAATGGCTGGTGAGAGCTTGGCCACGTCACTACC -3'
CPR5EX	5'-CCTCTACATAACCAAGGTCGGCTGCACTGG-3'

M = A, C, G-Wobble
5 = I = Inosin

7.2 Sequenzvergleich CYP73

```
CYP73A10        MMDFVLLEKALLGLFIATIVAITISKLRGKKLKLPPGPIPVPVFGNWLQVGDDLNQRNLV
CYP73A41        MMDFVLLEKALLGLFIATIVAITISKLRGKKLKLPPGPIPVPVFGNWLQVGDDLNQRNLV
CYP73A5         -MDLLLLEKSLIAVFVAVILATVISKLRGKKLKLPPGPIPIPIFGNWLQVGDDLNHRNLV
CYP73A4         -MDLLLLEKTLLGLFAAIIVASIVSKLRGKKFKLPPGPIPVPVFGNWLQVGDDLNHRNLS
CYP73A19        -MDLLLLEKTLLALFIAATIAITISKLRGKRFKLPPGPIPVPVFGNWLQVGDDLNHRNLT
CYP73A3         -MDLLLLEKTLLALFIAATIAVTISKLRGKRFKLPPGPIPVPIFGYWLQVGDDLNHRNLT
CYP73A9         -MDLLLLEKTLLALFLAAITAITISKLRGKPFKLPPGPFPVPVFGNWLQVGDDLNHRNLT
CYP73A14        -MDLLLLEKTLLGLFIAAITAIAISKLRGRRFKLPPGPIPVPIFGNWLQVGDDLNHRNLT
CYP73A11        -MDLLLLEKTLIGLFLAAVVAIAVSTLRGRKFKLPPGPLPVPIFGNWLQVGDDLNHRNLT
CYP73A1         -MDLLLIEKTLVALFAAIIGAILISKLRGKKFKLPPGPIPVPIFGNWLQVGDDLNHRNLT
CYP73A12        -MDLLLVEKTLLALFAAIIASIFISKLRGKRFKLPPGPVPVPIFGNWLQVGDDLNHRNLT
CYP73A16        -MDLLLLE--------------------------------------------------
                 **::*:*
Prim.cons.      MMDLLLLEKTLLALFIAAIVAITISKLRGKKFKLPPGPIPVPIFGNWLQVGDDLNHRNLT


                        70        80        90       100       110       120
                         |         |         |         |         |         |
CYP73A10        DYAKKFGDLFMLRMGQRNLVVVSSPELAKDVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A41        EYAKKFGDLFLLRMGQRNLVVVSSPDLAKDVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A5         DYAKKFGDLFLLRMGQRNLVVVSSPDLTKEVLLTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A4         DYAKKFGEIFLLRMGQRNLVVVSSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A19        DLAKRFGDIFLLRMGQRNLVVVSSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A3         DYAKRFGEIFLLRMGQRNLVVVSSPELAKEVLHTQCVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A9         DLAKRFAEILLLRMEQRNLVVISSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDIVF
CYP73A14        DLAKRFGDIFLLRMGQRNLVVVSSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A11        DLAKKFGDIFLLRMGQRNLVVVSSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A1         DLAKRFGEILLLRMGQRNLVVVSSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A12        DLAKKFGEIFLLRMGQRNLVVVSSPNLAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
CYP73A16        -LAKKFGDIFLLRMGQRNLVVVSSPDLSKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF
                  **:*.::::*** ******:***:*:*:** ** *********************:**
Prim.cons.      DLAKKFGDIFLLRMGQRNLVVVSSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVF


                       130       140       150       160       170       180
                         |         |         |         |         |         |
CYP73A10        TVYSEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRFGWEDEAARVVED-------------------
CYP73A41        TVYSEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRFGWEDEAARVVED-------------------
CYP73A5         TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQNREGWEFEAASVVED-------------------
CYP73A4         TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRYGWEEEAARVVED-------------------
CYP73A19        TVYGT-LAEMRRIMTVPFFTNKVVQQYRFGWEFEAQSVVDD-------------------
CYP73A3         TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRYGWESEAESVVND-------------------
CYP73A9         TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRFGWESEAASVVDD-------------------
CYP73A14        TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRFGWESEAASVVDD-------------------
CYP73A11        TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRHGWESEAAAVVED-------------------
CYP73A1         TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRYGWEAEAAAVVDD-------------------
CYP73A12        TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRTGWEAEAAAVVDD-------------------
CYP73A16        TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRYGWEEEAAQVVEDKTLLGSFVAVLVAILVSKL
                ***.    :***************** * *** **  **:*
Prim.cons.      TVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRFGWESEAASVVEDKTLLGSFVAVLVAILVSKL
```

```
                     190       200       210       220       230       240
                       |         |         |         |         |         |
CYP73A10       ----------------------------------VKANPEAATNGIVLRNRLQLLMYNNM
CYP73A41       ----------------------------------VKANPEAATNGIVLRNRLQLLMYNNM
CYP73A5        ----------------------------------VKKNPDSATKGIVLRKRLQLMMYNNM
CYP73A4        ----------------------------------VKKNPESATNGIVLRRRLQLMMYNNM
CYP73A19       ----------------------------------VKKNPEACSSGIVLRRRLQLMMYNIM
CYP73A3        ----------------------------------VKNNAEASVGGIVIRKRLQLMMYNIM
CYP73A9        ----------------------------------VKKNSKASVNGIVIRRRLQLMMYNIM
CYP73A14       ----------------------------------VRRNPDAAAGGIVLRRRLQLMMYNNM
CYP73A11       ----------------------------------VKKNPDAAVSGTVIRRRLQLMMYNNM
CYP73A1        ----------------------------------VKKNPAAATEGIVIRRRLQLMMYNNM
CYP73A12       ----------------------------------VKKNPKAATEGVVIRKRLQLMMYNNM
CYP73A16       RGKRFKLPPGPLPVPVFGNWLQVGDDLNHRNLTDVKKNPEAATNGIVLRRRLQLMMYNNM
                                                 *: *. :.  * *:*.****:*** *
Prim.cons.     RGKRFKLPPGPLPVPVFGNWLQVGDDLNHRNLTDVKKNPEAATNGIVLRRRLQLMMYNNM


                     250       260       270       280       290       300
                       |         |         |         |         |         |
CYP73A10       YRIMFDRRFESVDDPLFLKLKALNGERSRLAQSFEYHFGDFIPILRPFLRGYLKLCQEIK
CYP73A41       YRIMFDRRFESVDDPLFLKLKALNGERSRLAQSFEYNFGDFIPILRPFLRGYLKLCQEIK
CYP73A5        FRIMFDRRFESEDDPLFLRLKALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLRGYLKICQDVK
CYP73A4        YRIMFDRRFESEDDPLFVKLKALNGERSRLAQGFEYNYGDFIPILRPFLRGYLRICKEVK
CYP73A19       YRIMFDRRFESEEDPLFVKLKALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLKGYLKLCKEVK
CYP73A3        YRIMFDRRFESEEDPLFVKLKALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLKGYLKVCKEVK
CYP73A9        YRIMFDRRFESEEDPLFVKLKALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLKGYLKVCKEVK
CYP73A14       YRIMFDRRFESEEDPLFVKLKALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLKGYLKICKEVK
CYP73A11       YRIMFDRRFESEEDPIFQRLRALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLKGYLKICKEVK
CYP73A1        FRIMFDRRFESEDDPLFLKLKALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLRNYLKLCKEVK
CYP73A12       FRIMFDRRFESEDDPLFVKLKMLNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLKGYLKLCKEVK
CYP73A16       YRIMFDRRFESEDDPLFNKLKALNGERSRLAQSFDYNYGDFIPILRPFLRGYLKICQEVK
               :********** :**:* :*: **********.*:*::***********:.**::*:::*
Prim.cons.     YRIMFDRRFESEDDPLFVKLKALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFL2GYLK2CKEVK


                     310       320       330       340       350       360
                       |         |         |         |         |         |
CYP73A10       DKRLKLFKDYFVDERKKLESIKSVD-NNSLKCAIDHIIEAQQKGEINEDNVLYIVENINV
CYP73A41       DKRLKLFKDYFVDERKKLESIKSVG-NNSLKCAIDHIIEAQEKGEINEDNVLYIVENINX
CYP73A5        DRRIALFKKYFVDERKQIASSKPTG-SEGLKCAIDHILEAEQKGEINEDNVLYIVENINV
CYP73A4        ERRLQLFKDYFVDERKKFGSTKSMD-NNSLKCAIDHILEAQQKGEINEDNVLYIVENINV
CYP73A19       DRRLQLFKDYFVDERKKLGSTKSTT-NEGLKCAIDHILDAQQKGEINDDNVLYIVENINV
CYP73A3        DRRLQLFKDYFVDERKKLESTKSTTSNDGLKCAIDHILDAQKKGEINDDNVLYIVENINV
CYP73A9        DRRLQLFKDYFVDERKKLGSTKSTY-NEGLKCAIDHILDAQKKGEINDDNVLYIVENINV
CYP73A14       ERRLKLFKDYFVDERMKLESTKSTS-NEGLKCAIDHILDAQKKGEINEDNVLYIVENINV
CYP73A11       ETRLKLFKDYFVDERKKLGSTKSTNNNNELKCAIDHILDAQRKGEINEDNVLYIVENINV
CYP73A1        DKRIQLFKDYFVDERKKIGSTKKMD-NNQLKCAIDHILEAKEKGEINEDNVLYIVENINV
CYP73A12       EKRFQLFKDYFVDERKKLGSTKSMD-NNQLKCAIDHILDAKDKGEINEDNVLYIVENINV
CYP73A16       ERRLQLFKDYFVDERKKLASTKNMS-NEGLKCAIDHILDAQKKGEINEDNVLYIVENINV
               : *: ***.****** :: * *    .: ********::*: *****:***********
Prim.cons.     DRRLQLFKDYFVDERKKLGSTKSTD2NNGLKCAIDHILDAQ2KGEINEDNVLYIVENINV
```

```
                      370       380       390       400       410       420
                        |         |         |         |         |         |
CYP73A10        AAIETTLWSIEWGIAELVNNPEIQKKLRHELDTVLGAGVQICEPDVQKLPYLQAVIKETL
CYP73A41        AAIETTLWSIEWGIAELVNNPEIQKKLRHELDTVLGAGVQICEPDVQKLPYLQAVIKETL
CYP73A5         AAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQSKLRNELDTVLGPGVQVTEPDLHKLPYLQAVVKETL
CYP73A4         AAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQKKLRDELETVLGPGVQITEPDTYKLPYLQAVIKETL
CYP73A19        AAIETTLWSIEWGIAELVNHQKIQNKVREEIDRVLGPGHQVTEPDLQKLPYLQAVIKETL
CYP73A3         AAIETTLWSIEWGIAELVNHQDIQNKVREEMDRVLGPGHQVTEPDLHKLPYLQAVIKETL
CYP73A9         AAIETTLWSIEWGIAELVNHQEIQNKLREEMDKVLGPGHQVTEPDLEKLPYLQAVIKETL
CYP73A14        AAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQKKVRDEIDRVLGPGHQVTEPDMQKLPYLQAVIKETL
CYP73A11        AAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQQKLRDEIDRVLGAGHQVTEPDIQKLPYLQAVVKETL
CYP73A1         AAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQAKLRHELDTKLGPGVQITEPDVQNLPYLQAVVKETL
CYP73A12        AAIETTLWSIEWAIAELVNHPEIQAKLRHELVSQLGPGVQVTEPDLHKLPYLQAVIKETL
CYP73A16        AAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQKKLRHELDTLLGPGHQITEPDTYKLPYLNAVVKETL
                ************.******: .** *:*.*:   **.* *: ***  :****:**:****
Prim.cons.      AAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQKKLRHELDTVLGPG2QVTEPDLQKLPYLQAVIKETL


                      430       440       450       460       470       480
                        |         |         |         |         |         |
CYP73A10        RYRMAIPLLVPHMNLHDAKLAGYDIPAESKILVNAWWLANNPAHWNKPDEFRPERFLEEE
CYP73A41        RYRMAIPLLVPHMNLHEAKLAGYDIPAESKILVNAWWLANNPAHWNKPDEFRPERFLEEE
CYP73A5         RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLAGYDIPAESKILVNAWWLANNPNSWKKPEEFRPERFFEEE
CYP73A4         RLRMAIPLFLPHMNLHDAKLGGYDIPAESKILVNAWFLANNPEHWKKPEEFRPERFLEEE
CYP73A19        RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLSGFDIPAESKILVNAWWLANNPAQWKKPEEFRPERFLEEE
CYP73A3         RLRMAIPLLVPHMNLHDPKLNGFDIPAESKILVNAWWLPNNPAHWKKPEEFRPERFLEEE
CYP73A9         RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGGFDIPAESKILVNAWWLANNPALWKKPEEFRPERFLEEE
CYP73A14        RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGGYDIPAESKILVNAWWLANNPANWKRPEEFRPERFLEEE
CYP73A11        RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGGYDIPAESKILVNAWWLANNPAHWKKPEEFRPERFFEEE
CYP73A1         RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGGFDIPAESKILVNAWWLANNPDQWKKPEEFRPERFLEEE
CYP73A12        RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGGYDIPAESKILVNAWWLANNPDQWKKPEEFRPERFLEEE
CYP73A16        RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGGFDIPAESKILVNAWWLANNPAHWKNPEEFRPERFLEEG
                * ******::******:.** *:**************:*.***  *:.*:*******:**
Prim.cons.      RLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGGYDIPAESKILVNAWWLANNPAHWKKPEEFRPERFLEEE


                      490       500       510       520       530       540
                        |         |         |         |         |         |
CYP73A10        SKVEANGNDFKYIPFGVGRRSCPGIILALPILGIVIGRLVQNFELLPPPGQSKIDTAEKG
CYP73A41        SKVEANGNDFKYIPFGVGRRSCPGIILALPILGIVIGRLVQNFELLPPPGQSKIDTAEKG
CYP73A5         SHVEANGNDFRYVPFGVGRRSCPGIILALPILGITIGRMVQNFELLPPPGQSKVDTSEKG
CYP73A4         SKVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITIGRLVQNFELLPPPGKSKIDTSEKG
CYP73A19        SHVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKIDTAEKG
CYP73A3         SHVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITIGRLVQNVELLPPPGQSKIDTSEKG
CYP73A9         AHVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITIGRLVQNFELLPPPGQSKIDTSEKG
CYP73A14        SHVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKLDTAEKG
CYP73A11        SLVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSQIDTSEKG
CYP73A1         AKVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITIGRLVQNFELLPPPGQSKIDTDEKG
CYP73A12        SKVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITIGRLVQNFELLPPPGQDKVDTTEKG
CYP73A16        AKVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKIDTSEKG
                : ********:*:*********************.:**:***.*******:.::** ***
Prim.cons.      SKVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITIGRLVQNFELLPPPGQSKIDTSEKG
```

```
                        550       560
                          |         |
CYP73A10        GQFSLQILKHSTIVCKPRSL-
CYP73A41        GQFSLQILKHSTIVCKPRSS-
CYP73A5         GQFSLHILNHSIIVMKPRNC-
CYP73A4         GQFSLHILKHSTIVLKPRTF-
CYP73A19        GQFSLHILKHSTIVCKPRSFN
CYP73A3         GQFSLHILKHSTIVAKPRSF-
CYP73A9         GQFSLHILKHSTIVAKPRAF-
CYP73A14        GQFSLHILKHSTIVAKPRSF-
CYP73A11        GQFSLHILKHSTIVAKPRSF-
CYP73A1         GQFSLHILKHSTIVAKPRSF-
CYP73A12        GQFSLHILKHSTIVAKPRVL-
CYP73A16        GQFSLHILKHSTIVAKPRSF-
                *****:**:** ** ***
Prim.cons.      GQFSLHILKHSTIVAKPRSFN
```

7.3 Datenbank-Nummern und Referenzen

Cytochrom	Funktion	Herkunft	Accession No.	Referenzen
CYP73A1	C4H	*Helianthus tuberosus*	Q04468	Teutsch *et al*., 1993
CYP73A2	C4H	*Phaseolus aureus*	L076343	Mizutani *et al*., 1993
CYP73A3	C4H	*Medicago sativa*	L11046	Fahrendorf u. Dixon, 1993
CYP73A4	C4H	*Catharanthus roseus*	Z32563	Hotze *et al*., 1995
CYP73A5	C4H	*Arabisopsis thaliana*	P92994	Bell-Lelong *et al*., 1997
CYP73A9	C4H	*Pisum sativum*	U29243	Frank *et al*.
CYP73A10	C4H	*Petroselinum crispum*	Q43033	Logemann *et al*., 1995
CYP73A11	C4H	*Glycine max*	Q42797	Schopfer u. Ebel., 1998
CYP73A12	C4H	*Zinnia elegans*	Q43240	Ye *et al*., 1996
CYP73A14	C4H	*Glycyrrhiza echinata*	Q96423	Akashi *et al*., 1997
CYP73A15	C4H	*Phaseolus vulgaris*	O24315	Jupe *et al*., 1996
CYP73A16	C4H	*Populus kitakamiensis*	Q43054	Kawai *et al*., 1996
CYP73A17	C4H	*Triticum aestivum*	AF123608	Batard *et al*., 2000
CYP73A19	C4H	*Cicer arietinum*	O81928	Overkamp *et al*., 2000
CYP73A32	C4H	*Ruta graveolens*	AF548370	Gravot, 2002
CYP73A41	C4H	*Ammi majus*	AY219918	Hübner *et al*., 2003
CYP84A1	F5H	*Arabidopsis thaliana*	AF267140	Meyer *et a*l., 1996
CYP98A3		*Arabidopsis thaliana*	AC0022458	Werck-Reichhart
CYP98A6	4-coumaroyl-4`-hydroxyohenyllactic acid 3-hydroxylese	*Lithospermum erythrorhizon*	AB017418	Matsuno *et al*., 2002
CYP98A13	C3H	*Ocimum basilicum*	Q8L5H8	Gang u. Pichersky, 2002
CYP98A19	C3H	*Pinus taeda*	Q8VZH6	Anterola *et al*., 2001
CYP98A20	C3H	*Sesamum indicum*	Q8VWQ9	Ichikawa *et al*., 2001
CYP76B6	G10H	*Catharanthus roseus*	AJ251269	Collu *et al*., 2001
ATR1	CPR	*Arabidopsis thaliana*	X66016	Urban *et al*., 1997
ATR2	CPR	*Arabidopsis thaliana*	X66017	Urban *et al*., 1997
HTR1	CPR	*Helianthus tuberosus*	Z26250	Lesot *et al*., 1995
HTR3	CPR	*Helianthus tuberosus*	Z26251	Hasenfratz *et al.*

7.4 Codes der Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	Codons
Alanin	Ala	A	GCC, GCT, GCG, GCA
Arginin	Arg	R	CGC, CGG, CGT, CGA, AGA, AGG
Asparagin	Asn	N	AAT, AAC
Asparaginsäure	Asp	D	GAT, GAC
Cystein	Cys	C	TGT, TGC
Glutaminsäure	Glu	E	GAA, GAG
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Glycine	Gly	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Histidin	His	H	CAT, CAC
Isoleucin	Ile	I	ATT, ATC, ATA
Leucin	Leu	L	TTA, TTG, CTA, CTG, CTT, CTC
Lysin	Lys	K	AAA, AAG
Methionin	Met	M	ATG
Phenylalanin	Phe	F	TTC, TTT
Prolin	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Serin	Ser	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Threonin	Thr	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Tyrosin	Tyr	Y	TAT, TAC
Tryptophan	Trp	W	TGG
Valin	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Stop			TAA, TAG, TGA

7.5 Internetadressen

http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html

http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

http://www.ebi.ac.uk/clustalw/

http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/

Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Als erstes danke ich sehr herzlich Herrn Professor Matern für die interessante Themenstellung, die immer gewährte Unterstützung und die äußerst hilfreichen und wertvollen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Dr. Lukačin gebührt besonderer Dank für die intensive Betreuung und die immer vorhandene Gesprächsbereitschaft.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. Martens, der mir zu jeder Zeit mit guten Ratschlägen weitergeholfen hat. Dies gilt vor allem für das Anlernen der DD-RT-PCR.

Für das Bereitstellen einiger Geräte der DD-RT-PCR danke ich Herrn Professor Forkmann (TU München).

Herrn Professor Batschauer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich bei Edgar Specker für die Synthese des Cumarsäuremethylesters sowie Kerstin Kranz für die Durchführung der HPLC-Analyse.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes und besonders allen Mit-Doktoranden der beiden Arbeitsgruppen und Frau Professor Petersen für die stete Hilfsbereitschaft und das nette Klima am Institut.

Nicht zuletzt danke ich allen, die im weiteren Sinne an der Entstehung dieser Arbeit teilgenommen haben: Meinen Freunden, meinen Eltern und meiner Schwester. Unschätzbarer Dank gilt meinem Mann Edgar Specker.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name:	Silvia Specker
Geburtsdatum:	07.04.1975
Geburtsort:	Venedig (Italien)
Familienstand:	verheiratet

Schulausbildung:

08/1981 - 07/1985	Grundschule Trier-Tarforst
08/1985 - 06/1989	Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Trier
08/1989 - 06/1994	Schillergymnasium, Münster
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium:

04/1995 - 10/1999	Pharmaziestudium an der Wilhelms-Universität Münster
04/1997	1. Staatsexamen
10/1999	2. Staatsexamen
11/2000	3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin

Praktisches Jahr:

01/1999 - 04/2000	Kreuz-Apotheke, Münster
05/2000 - 10/2000	Bayer AG, Leverkusen, Abteilung Mikrobiologie

Aktuelle Tätigkeit:

seit 01/2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Philipps-Universität Marburg;
	Anfertigung der Doktorarbeit unter Prof. Dr. U. Matern

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Klonierung von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen aus *Ammi majus* L. und funktionelle Expression der Zimtsäure 4-Hydroxylase“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

(Silvia Specker)