

Versuche zur Klonierung der
Rosmarinsäuresynthase und anderer
Gene der Rosmarinsäure-Biosynthese
aus *Coleus blumei*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Anja Berger
aus Wuppertal

2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. M. Petersen

Korreferent: Prof. Dr. A. W. Alfermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2001

1: EINLEITUNG 1

1.1: PFLANZLICHER SEKUNDÄRSTOFFWECHSEL	1
1.2: FUNKTION VON SEKUNDÄRSTOFFEN.....	1
1.3: ROSMARINSÄURE.....	2
1.4: PFLANZLICHE ZELLKULTUREN.....	3
1.5: COLEUS BLUMEI	6
1.6: ROSMARINSÄURE PRODUZIERENDE ZELLKULTUREN VON <i>COLEUS BLUMEI</i>.....	7
1.7: BIOSYNTHESE DER ROSMARINSÄURE	7
1.7.1: PHENYLALANIN AMMONIUM-LYASE (PAL).....	9
1.7.2 ZIMTSÄURE 4-HYDROXYLASE (CAH).....	9
1.7.3: 4-CUMARAT:COA LIGASE (4CL).....	9
1.7.4: TYROSIN AMINOTRANSFERASE (TAT).....	10
1.7.5: HYDROXYPHENYLPYRUVAT REDUKTASE (HPPR)	10
1.7.6: ROSMARINSÄURESYNTHESE (RAS).....	10
1.7.7: DIE 3- UND 3'- HYDROXYLIERUNG DER AROMATISCHEN RINGE	11
1.8: AUFGABENSTELLUNG.....	11

2: MATERIAL UND METHODEN..... 12

2.1: ENZYME FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	12
2.2: VEKTOREN UND KITS	12
2.3: CHEMIKALIEN	12
2.4: GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL	14
2.5: PFLANZENMATERIAL.....	16
2.5.1: SUSPENSIONSKULTUREN VON <i>COLEUS BLUMEI</i>	16
2.5.2: KULTURMEDIEN.....	16
2.6: ALLGEMEINE METHODEN.....	18
2.6.1: DNA UND RNA	18
2.6.1.1: DNA-Isolation aus <i>Coleus blumei</i>	18
2.6.1.2: DNA-Isolation aus Lambda -Phagen.....	18
2.6.1.3: DNA-Isolation aus Bakterien.....	19
2.6.1.4: RNA-Isolation aus <i>Coleus blumei</i>	19
2.6.1.4.1: mRNA-Isolation aus Gesamt-RNA von <i>Coleus blumei</i>	19
2.6.1.4.2: Entfernen von Polysacchariden aus RNA-Präparationen	19
2.6.1.5: Elektrophorese von Nukleinsäuren	20
2.6.1.5.1 Gele für DNA-Auftrennung nach Größe	20
2.6.1.5.2 Gele für RNA-Auftrennung nach Größe.....	20
2.6.1.6: Isolation von DNA aus Agarosegelen	20
2.6.1.6.1: DNA-Isolation aus "Low Melt Agarose".....	20
2.6.1.6.2: DNA-Isolation durch Elektroelution	21
2.6.1.7: Klonierung und Modifikation von DNA	21
2.6.1.7.1: Verdau mit Restriktionsendonukleasen	21
2.6.1.7.2: Klonieren in Plasmidvektoren	21
2.6.1.7.2.1: Dephosphorylierung von Vektor DNA (pKS ⁻ und pKSII ⁻).....	21
2.6.1.7.2.2: Ligieren von PCR-Fragmenten in pGEM [®] -T	21
2.6.1.7.2.3: Ligieren von DNA-Fragmenten in pKS ⁻ und pKSII ⁻	21
2.6.1.8: Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	22
2.6.1.8.1: Southern Blot	22
2.6.1.8.2: Northern Blot	22
2.6.1.8.3: Dot- und Slot Blot Transfer	22
2.6.1.9: Markierung von DNA-Fragmenten	22
2.6.1.9.1: „Random priming“ mit „DIG-High Prime“	24

2.6.1.9.2: Endmarkierung von Sonden mit dem „DIG Oligonucleotide 3’-End Labeling Kit“	24
2.6.1.10: Filterhybridisierung von DNA-Fragmenten:	25
2.6.1.10.1: DNA / DNA- sowie DNA / RNA-Hybridisierung	25
2.6.1.11: Detektion von an Filter gebundenen Nukleinsäuren	25
2.6.1.12: Entfernen von Sonden von der Membran (stripping)	26
2.6.1.12.1: Befreien der Membran von DNA-Sonden bei Hybridisierung mit DNA	26
2.6.1.12.2: Befreien der Membran von DNA-Sonden bei Hybridisierung mit RNA	26
2.6.2: PROTEINE:	27
2.6.2.1: Bestimmung der Proteinkonzentration	27
2.6.2.2: Elektrophorese von Proteinen	27
2.6.2.2.1: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS -PAGE)	27
2.6.2.2.2: Probenbehandlung:	27
2.6.2.2.3: Acrylamid-Gele:	28
2.6.2.2.4: Elektrodenpuffer und Elektrophorese	28
2.6.2.3: Färbemethoden für Proteine in Gelen:	29
2.6.2.3.1: Silberfärbung:	29
2.6.2.3.2: Färbung nach Coomassie	29
2.6.2.4: Proteinsequenzierung	29
2.6.2.4.1: Tryptischer Verdau	29
2.6.2.4.2: Entsalzen der Peptide	30
2.6.2.4.3: MALDI-TOF	30
2.6.2.4.4: Nano-ES	30
2.6.3 PHAGEN UND BAKTERIEN:	32
2.6.3.1: Medien für die Bakterienanzucht:	32
2.6.3.2: Anzucht von Bakterien	32
2.6.3.2.1: Anzucht auf Platten	32
2.6.3.2.2: Anzucht in flüssigem Medium	32
2.6.3.2.3: Anzucht von Wirtszellen für Lambda-Phagen	32
2.6.3.3: Aufbewahrung von Bakterien	32
2.6.3.3.1: Herstellen von Glycerol-Stammkulturen	32
2.6.3.3.2: Herstellung gefrierkompetenter Bakterien	33
2.6.3.4: Transformation von Bakterien	33
2.6.3.5: Anzucht von Phagen	33
2.6.3.5.1: Anzucht in flüssigem Medium	33
2.6.3.5.2: Anzucht auf festem Medium	33
2.6.3.6: Vermehrung der gewünschten Phagen	34
2.6.3.7: "Plaque-Lifting"	34
2.7: CHARAKTERISIERUNG VON <i>COLEUS</i> SUSPENSIONSKULTUREN	35
2.7.1: MEDIUMSPARAMETER	35
2.7.2: WACHSTUMSPARAMETER:	35
2.7.2.1: Bestimmung des Frischgewichtes	35
2.7.2.2: Bestimmung des Trockengewichtes	35
2.7.3: INHALTSSTOFFE	35
2.7.3.1: Bestimmung des Rosmarinsäure- und Isorinsäure-Gehaltes:	35
2.7.4: ENZYMAKTIVITÄTEN:	36
2.7.4.1: Bestimmung der PAL-Aktivität:	36
2.7.4.2: Bestimmung der RAS-Aktivität:	36
2.7.4.2.1: Substrate für die Rosmarinsäuresynthese	36
2.7.4.2.1.1: Synthese des Caffeoyl-CoA-Esters	36
2.7.4.2.1.2: Reinigung des Caffeoyl-CoA-Esters	36
2.7.4.2.2: Enzymtest zur Bestimmung der RAS-Aktivität	37
2.7.4.2.3: HPLC-Analytik	37
2.8: METHODEN ZUR REINIGUNG DER ROSMARINSÄURESYNTHASE	39
2.8.1: REINIGUNGSSCHRITTE:	39
2.8.1.1: Herstellung eines Enzym-Rohextraktes	39

2.8.1.2: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.....	39
2.8.1.3: Säulenchromatographische Methoden.....	40
2.8.1.3.1: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Fractogel TSK Butyl.....	40
2.8.1.3.2: Affinitätschromatographie.....	40
2.8.1.3.2.1: R-2328 Reactive Yellow 86 Agarose.....	41
2.8.1.3.2.2: Fractogel TSK AF-Blue.....	41
2.8.1.4: Native Gelelektrophorese.....	41
2.8.1.4.1: Probenbehandlung.....	42
2.8.1.4.2: Acrylamid-Gele.....	42
2.8.1.4.3: Elektrodenpuffer und Elektrophorese.....	42
2.8.1.4.4: Detektion der RAS-Aktivität im Gel.....	42
2.9: METHODEN ZUR KLONIERUNG DER PHENYLALANIN AMMONIUM-LYASE.....	43
2.10: METHODEN ZUR KLONIERUNG DER ROSMARINSÄURESYNTHESE.....	44
2.10.1: ERSTELLEN EINER FRAKTIONIERTEN CDNA-BANK.....	44
2.10.2: DURCHSUCHEN VON CDNA-BANKEN.....	44
2.10.3: PCR.....	45
2.10.3.1: PCR-Primer und Bedingungen.....	45
2.10.3.2: RT-PCR:.....	47
2.10.3.3: 3'- UND 5'-RACE-PCR UND SMART™ CDNA SYNTHESE.....	48
2.11: METHODEN ZUR KLONIERUNG DER 4-CUMARAT:COA LIGASE.....	50
2.12: SEQUENZIERUNGEN.....	51
<u>3: ERGEBNISSE:.....</u>	<u>52</u>
3.1: CHARAKTERISIERUNG DER SUSPENSIONSKULTUR COL. 20.....	52
3.1.1: MEDIUMSPARAMETER:.....	52
3.1.2: WACHSTUM:.....	54
3.1.3: ROSMARINSÄUREAKKUMULATION:.....	55
3.1.4: ENZYM-AKTIVITÄTEN.....	56
3.1.4.1: Aktivität der Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL).....	56
3.1.4.2: Aktivität der Rosmarinsäuresynthase (RAS).....	56
3.2: CHARAKTERISIERUNG DER KULTUR COL. M1.....	57
3.2.1: WACHSTUM.....	58
3.2.2: ROSMARINSÄUREGEHALT UND RAS-AKTIVITÄT:.....	59
3.3: CHARAKTERISIERUNG DER KULTUR COL. M5.....	60
3.3.1: MEDIUMSPARAMETER.....	60
3.3.2: WACHSTUM.....	62
3.3.3: ROSMARINSÄURE- UND ISORINSÄURE-GEHALT.....	63
3.3.4: ENZYMAKTIVITÄTEN.....	65
3.3.4.1: PAL-Aktivität.....	65
3.3.4.2: RAS-AKTIVITÄT.....	66
3.4: EXPRESSIONSSTUDIEN.....	67
3.4.1: EXPRESSIONSMUSTER DER PAL.....	67
3.4.2: EXPRESSIONSMUSTER DES MÖGLICHEN RAS-KLONS.....	69
3.5: PROTEINREINIGUNG.....	71
3.5.1: AMMONIUMSULFATFÄLLUNG.....	71
3.5.2: HYDROPHOBE INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE (HIC) AN FRACTOGEL TSK BUTYL:	71
3.5.3: AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN „R-2382 REACTIVE YELLOW 86 AGAROSE“:.....	72
3.5.4: AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN FRACTOGEL TSK AF-BLUE:.....	73
3.5.5: NATIVE GELELEKTROPHORESE.....	76
3.6.: PROTEINSEQUENZIERUNG:.....	78
3.7: KLONIERUNG DER PAL.....	79
3.8: KLONIERUNG DER RAS.....	81
3.8.1: SUCHE IN CDNA-BANKEN.....	81

3.8.2: Klonierung über PCR	81
3.8.3: RT-PCR	82
3.8.4: Southern- und Northern-Blotting	83
3.8.5: 3'- und 5'-RACE-PCR	84
3.8.6: Sequenzierung der RAS-Klone	84
3.9: Klonierung der 4CL	84
3.9.1: Suche in cDNA-Banken	84
3.9.2: PCR / RT-PCR	85
<u>4: Diskussion</u>	<u>86</u>
4.1: Charakterisierung der Suspensionskulturen Col. 20, Col. M1 und Col. M5	86
4.2: Expressionsstudien	89
4.2.1: Expressionsmuster der PAL	89
4.2.2: Expressionsmuster des möglichen RAS-Klones	90
4.3: Reinigung der Rosmarinsäuresynthase	90
4.4: Klonierung der Phenylalanin Ammonium-Lyase	92
4.5: Klonierung der Rosmarinsäuresynthase	93
4.5.1: Suche in cDNA-Banken	93
4.5.2: Klonierung über PCR	94
4.5.3: Klonierung über RT-PCR	94
4.5.4: Southern und Northernblotting	94
4.5.5: RACE-PCR	95
4.5.6: Sequenzierung der Klone	96
4.6: Klonierung der 4-Cumarat:CoA Ligase	100
<u>5: Zusammenfassung</u>	<u>104</u>
5.1: Ausblick	105
<u>6: Anhang</u>	<u>106</u>
6.1: Sequenzen	106
6.1.1: Sequenzvergleich der PAL-Klone	106
6.1.2: Sequenzen der möglichen RAS-Klone	110
6.1.2.1: DNA-Sequenz und mögliche Proteinsequenzen des Klones RAS-1.1	110
6.1.2.1: Vergleich der Sequenzen RAS-1.1 und der über RACE-PCR erhaltenen Sequenz RAS-3	114
6.1.3: Sequenzen verschiedener 4CL-Klone	116
6.2: Literaturverzeichnis	120
Abkürzungsverzeichnis	129
Danksagungen	130

1: Einleitung

1.1: Pflanzlicher Sekundärstoffwechsel

Pflanzen bilden neben den als primäre Stoffwechselprodukte bezeichneten Substanzen, die für die Pflanze unmittelbar zum Leben notwendig sind, eine große Zahl chemisch sehr unterschiedlicher Stoffe, die sogenannten Sekundärstoffe. Während der Primärstoffwechsel recht universell, uniform und konservativ ausgelegt ist, erscheint der Sekundärstoffwechsel adaptiv, vielfältig und oft artspezifisch (Richter 1996). Trotzdem ist eine reine Unterteilung von Primär- und Sekundärstoffwechsel, nach der Funktion des Stoffes, für die Pflanze nicht möglich, da viele Stoffklassen hier in beide Kategorien fallen würden, wie z.B. Lignine. Sie gewährleisten einerseits, als makromolekulare Struktur, die Stabilität der Pflanze und somit auch ihr Wachstum und stehen andererseits als phenolische Verbindung zur Abwehr von Pflanzenpathogenen und Mikroorganismen zur Verfügung (Freytag und Hahlbrook, 1992). Sie sind somit in beiden Kategorien des Stoffwechsels wirksam. Sinnvoller ist es, davon auszugehen, dass Primär- und Sekundärstoffwechsel zwar unterschiedliche Ebenen im Stoffwechselgeschehen pflanzlicher Organismen einnehmen, gemeinsam aber den ordnungsgemäßen Ablauf des Lebenszyklus der Pflanze gewährleisten. Hierzu gehören auch Abwehrstrategien gegen Pathogenbefall oder Fraßfeinde.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum, das den Sekundärstoffwechsel vom Primärstoffwechsel unterscheidet, ist die Vielfalt der Derivate, die sich von einem Grundgerüst ableiten. Während im Primärstoffwechsel im Normalfall ein Stoffwechselweg zu einem Produkt führt, verzweigen sich die Synthesewege für Sekundärstoffe oft vielfach und führen so zu einer ganzen Palette verwandter Strukturen. Dies wirft die Frage auf, wie es der Pflanze möglich ist, diese enorme Vielfalt in der Synthesekapazität sinnvoll im Einklang mit ihrem Lebenszyklus zu steuern (Richter 1996). Pflanzen helfen sich häufig dadurch, dass die vom Synthesehauptweg abzweigenden Seitenwege in bestimmten Kompartimenten untergebracht sind und sich so die Möglichkeit ergibt, diese Einzelwege getrennt und unabhängig voneinander zu regulieren. Auch werden nicht selten die Produkte eines solchen Seitenwegs vom Ort der Synthese abgezogen und an anderer Stelle, oft in spezialisierten Zellen oder Gewebetypen, gespeichert. Eine solche räumliche und zeitliche Trennung von Synthese und Speichervorgängen ermöglicht viele Ansatzstellen für effektive Regulationsvorgänge (Richter 1996)

Inwieweit nun welche Sekundärstoffe, abhängig oder unabhängig vom Differenzierungsstand der Pflanze oder aufgrund von Fremdeinflüssen produziert werden und durch welche regulatorischen Vorgänge dies beeinflusst wird, ist eine der zentralen Fragen bei der Beschäftigung mit dem Sekundärstoffwechsel überhaupt.

1.2: Funktion von Sekundärstoffen

Sekundärstoffe spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Pflanze mit ihrer Umwelt (Harborne 1995). Dies kann die Anlockung von Nützlingen, die Abwehr von Schädlingen (Menke 1990; Proksch 1991) und Mikroorganismen (Carle 1992) oder auch die Kommunikation von Pflanzen untereinander sein. Sie können der Pflanze Standortvorteile sichern, indem sie, von der Pflanze ausgeschieden, z.B. das Wachstum anderer Pflanzen hemmen oder, wie im Fall der Leguminosen, die Sekun-

därstoffe im Boden als Signal für bestimmte symbiotische Knöllchenbakterien nutzen, die ihr Vorteile bei der Stickstofffixierung sichern (Fisher und Long 1992). Auch für den Menschen sind pflanzliche Sekundärstoffe nicht unwichtig. Während wir uns an die uns täglich begegnenden Farb-, Geruchs- und Geschmacksstoffe und die stimulierenden Sekundärverbindungen wie Koffein, Theobromin, Theophyllin und Nikotin aus Kaffee, Kakao, Tee und Tabak schon gewöhnt haben, werden weitere Sekundärstoffe wie z. B. Herzglycoside, Kodein und diverse Alkaloide zu medizinisch-therapeutischen Zwecken eingesetzt. Saponine, Fette wie Kakaobutter oder Schleime aus der Aloe finden sich in Kosmetika, etherische Öle und andere Duftstoffe in der Parfümindustrie, Tannine werden zum Gerben von Leder eingesetzt (Luckner 1990).

Die Palette der chemischen Stoffklassen, zu denen die Sekundärstoffe gehören, besteht aus Alkaloiden, Terpenoiden, Phenylpropanderivaten und einigen anderen Verbindungsklassen. Die Zusammensetzung des Spektrums kann aber bereits innerhalb verwandter Arten deutliche Unterschiede aufweisen. Auch die Synthesewege für die einzelnen Sekundärstoffe können in einigen Fällen von Pflanzenart zu Pflanzenart variieren. Ob die Pflanzen hier verschiedene Strategien entwickelt haben, um parallel zu einer gleichen oder ähnlichen Lösung eines Überlebensproblems zu finden, also ob eine evolutionäre Parallelentwicklung oder eine konvergente Entwicklung vorliegt, muss für jeden Einzelfall noch geklärt werden.

1.3: Rosmarinsäure

Rosmarinsäure wurde erstmalig 1958 aus Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*) von Scarpati und Oriente (1958) isoliert und charakterisiert.

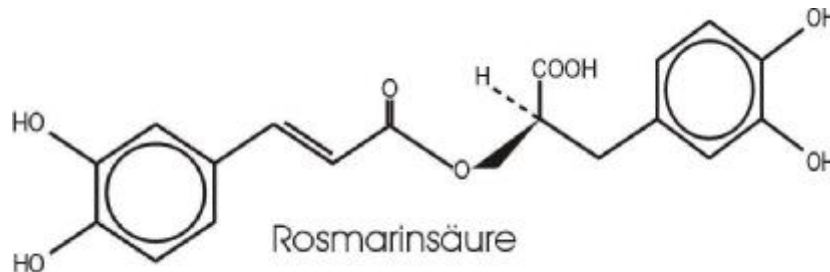


Abb. 1: Strukturformel der Rosmarinsäure

Molekular ist Rosmarinsäure (RA) ein Ester aus Kaffeesäure und 3,4-Dihydroxyphenyllactat und ist einer der am häufigsten im Pflanzenreich vorkommenden Kaffeesäureester. RA findet sich hauptsächlich in den Familien der Lamiaceen, hier speziell in der Unterfamilie Nepetoidea (Pedersen 2000), und Boraginaceen, konnte aber auch in taxonomisch weiter entfernt stehenden Pflanzengruppen wie Farnen und Hornmoosen (Häusler et al. 1992; Takeda et al. 1990; Zinsmeister et al. 1991) gefunden werden.

Pharmazeutisch interessant wird Rosmarinsäure durch ihre antiviralen, antibakteriellen und entzündungshemmenden Eigenschaften (Parnham und Kesselring 1985). Sie gilt als wirksame Substanz in Melissenpräparaten, die in einer Salbe gegen *Herpes simplex* (Lomaherpan, Lomapharm) eingesetzt werden (May und Willuhn 1978; Wölbling und Leonhard 1994) und ist als Bestandteil eines *Symphytum* Extraktes als entzündungshemmende Substanz in einer Salbe gegen Sportverletzungen enthalten (Traumaplant, Harras Pharma Curarina GmbH).

Reine Rosmarinsäure unterdrückt effektiv die komplementabhängigen Komponenten des Endotoxinschocks bei Kaninchen (De-Eknamkul und Ellis 1988). Für diesen Effekt wurden die durch Parnham und Kesselring (1985) festgestellten C3-Konvertase-hemmenden Eigenschaften verantwortlich gemacht, neuere Untersuchungen ergaben allerdings, dass die entzündungshemmende und die bei reiner RA durch Ito et al. (1998) propagierte antiallergische Wirkung eher auf eine kovalente Bindung der RA an den aktivierten Faktor C3b zurückzuführen sind (Sahu et al. 1999). Die Autoren zeigten Beweise dafür auf, dass RA die Komplementaktivierung vornehmlich dadurch verhindert, dass es mit dem aktivierten Thioester im naszenten C3b eine kovalente Bindung eingeht und somit die C3b-Anlagerung an Komplement-aktivierende Oberflächen verhindert.

Reine RA wirkt im weiteren gegen die komplementabhängige Stimulation der Prostaglandinsynthese (Rampart et al. 1986), blockiert die Opsonisierung (Verveijvan Vught et al. 1987), kann leicht über die Haut aufgenommen werden (Ritschel et al. 1989), und besitzt zusätzlich antioxidative Eigenschaften (Van Kessel et al. 1986; Ito et al. 1998).

In der Pflanze wirkt Rosmarinsäure wahrscheinlich als Abwehrstoff gegen Pilz- und Bakterieninfektionen und schützt unter Umständen gegen Fraßfeinde. Für eine solche Funktion in der Pflanze spricht, dass die phenolischen OH-Gruppen der RA chemisch oder enzymatisch zu Orthochinonen oxidiert werden können. Diese wiederum sind in der Lage, an Peptide zu binden und sie dadurch zu inaktivieren. Durch die Beobachtung, dass die Pflanzen RA in der Vakuole getrennt von Oxidasen speichern (Häusler und Petersen 1993) und eine solche Kompartimentierung nur bei Verletzungen der Zellen aufgelöst wird, wird diese Theorie unterstützt.

Zur Untersuchung der RA-Produktion sind pflanzliche Zellkulturen gut geeignet. Zellkulturen von *Coleus blumei* (Zenk et al. 1977), *Salvia officinalis* (Hippolyte et al. 1992) und *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul und Ellis 1988) und anderen Pflanzen akkumulieren RA in teilweise größeren Mengen, als sie in der Pflanze vorliegen.

1.4: Pflanzliche Zellkulturen

Suspensions- und Kalluskulturen bestehen aus weitgehend undifferenzierten, gleichförmigen Zellen. Manche Sekundärstoffe werden aber spezifisch in bestimmten Organen oder Geweben gebildet, die eine Zellkultur aufgrund ihrer mangelnden Differenzierung nicht besitzt. Auch sind Zellkulturen unter Umständen „instabil“. Dies bedeutet, dass sie die Fähigkeit, den gewünschten Stoff zu produzieren, nach einiger Zeit verlieren, da durch die Kulturtechnik möglicherweise in eine "andere Richtung" selektiert wird. Man kann diese Nachteile teilweise durch das „Zufüttern“ von Vorstufen ausgleichen und somit doch die gewünschten Produkte erhalten. Allerdings ist auch die sogenannte Biotransformation nicht in jedem Fall erfolgreich (Reinhard und Alfermann 1980).

Organkulturen, wie zum Beispiel Wurzel- oder Sprosskulturen, können in einigen Fällen zum Erfolg führen, da hier die Differenzierung weiter fortgeschritten ist als in einer Zell- oder Kalluskultur. Ein gutes Beispiel dafür ist die Biosynthese von Tropanalkaloiden in Solanaceen. Hier findet die Synthese von zum Beispiel Hyoscyamin und Scopolamin streng gewebespezifisch statt (De Luca und St. Pierre 2000). So findet die Umwandlung von Putrescin zu N-Methylputrescin ausschließlich im Perizykel der Wurzel, die Umwandlung von Tropinon zu Tropin in der Endodermis und äußeren Rinde und die Umwandlung von Hyoscyamin in Scopolamin wieder im Perizykel statt (De Luca und St. Pierre 2000). Aufgrund des für die Synthese nötigen Differenzierungsgrades der Zellen ist eine Synthese von diesen Alkaloiden in Kallus-

und Suspensionskulturen nahezu vollständig unterdrückt (Doerk-Schmitz 1993). Untersuchungen von jungen Wurzeln ergaben, dass entsprechende Enzymaktivität in der Wurzel auf eine relativ kleine Region der noch nicht vollständig ausdifferenzierten jungen Wurzel beschränkt ist (Nakajima und Hashimoto 1999). Dies könnte die Beobachtung erklären, dass die Synthese von Tropanalkaloiden in "hairy root" Kulturen, Kulturen die durch Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* induziertes starkes Wurzelwachstum zeigen, möglich ist. Für einige Alkaloide werden die Konzentrationen, die in intakten Wurzeln der Pflanze vorliegen, sogar überschritten, wobei der Abtransport durch den Spross in andere Pflanzenteile als Erklärung für die niedrigeren Alkaloidgehalte in intakten Wurzeln nicht ausreicht (Doerk-Schmitz 1993).

Eine Liste mit weiteren Publikationen, die auf Hairy root Kulturen und die in ihnen neu entdeckten oder mit ihrer Hilfe synthetisierten Sekundärstoffe eingeht, findet sich bei Shanks und Morgan (1999).

Es gibt allerdings auch einige Zellkulturlinien, die durchaus in der Lage sind, die gewünschten Sekundärstoffe zu produzieren – unter Umständen sogar in größeren Mengen, als sie in der Pflanze zu finden wären (Petersen 1993). Der Nutzen für die Grundlagenforschung, den solche Zellkulturen darstellen, ist hoch. Hier sind wichtige Anwendungsgebiete die Aufklärung von Stoffwechselwegen, sowie die Isolierung und Reinigung von Enzymen (Berlin 1986; Stöckigt et al. 1989; Zenk 1991). Gerade Kulturen, die bestimmte Sekundärstoffe in höherem Maßstab synthetisieren, werden verstärkt für solche Untersuchungen verwendet.

Auch werden bereits seit einigen Jahren die Wirkungen von Herbiziden an pflanzlichen Zellkulturen untersucht. So wurde zum Beispiel die Metabolisierung des Herbizides Isoproturon in Weizen- und Soja-Suspensionskulturen untersucht (Glaßgen et al. 1999). Ebenso wurde eine Studie zur Lokalisierung des Herbizides Difenzoquat innerhalb von Pflanzenzellen an resistenten und nicht resistenten Hafer-Suspensionskulturen durchgeführt (Kern und Dyer 1998).

Auch in der Biotechnologie können pflanzliche Zell- und Gewebekulturen von großem Nutzen sein. So werden zum Beispiel in der Pflanzenzucht Gewebekulturen zur Pflanzenvermehrung benutzt. Die sogenannte Meristemvermehrung, bei der man Spross- oder Wurzelmeristeme isoliert, um daraus später genetisch identische Pflanzen zu regenerieren, wird gerade bei seltenen oder schwer durch Samen vermehrbaren Pflanzen wie Orchideen praktiziert (Chen et al. 1999; Nayak et al. 1997).

Für die Erhaltung interessanter Pflanzen (seien dies nun ökologische oder wirtschaftliche Gründe), die nicht als Samen aufbewahrt werden können, ist die Einrichtung von Genbanken nicht mehr wegzudenken (Benson 1994). Hier lagern Zell- oder Meristemkulturen in gefrorenem Zustand, also kryokonserviert, und können so auch langfristig erhalten werden, sofern sie nach dem Auftauen dieselben Eigenschaften aufweisen wie vorher. Dies ist zwar häufig, aber nicht immer der Fall (Perez et al. 1997).

Sehr aktuell sind Untersuchungen zur Produktion von Antikörpern und Proteinen durch pflanzliche Zellkulturen (Terashima et al. 1999; Francisco et al. 1997; Magnuson et al. 1996). Hier bieten pflanzliche Zellkulturen den Vorteil, auf rein synthetischem, serumfreiem Medium wachsen zu können. Auch können pflanzliche Zellkulturen, im Gegensatz zu aus ihnen regenerierten Pflanzen, die das gewünschte Protein z.B. in Samen, Früchten oder Knollen speichern können (Kusnadi et al. 1995), bedeutend schneller das gewünschte Protein liefern (Terashima et al. 1999).

Ein weiterer Nutzen von pflanzlichen Zellkulturen liegt im Bereich der Produktion von Naturstoffen. Zur Gewinnung von Pflanzenstoffen werden häufig auf großen Flächen Pflanzen angebaut oder sie werden aus natürlichen Beständen gesammelt.

Dies kann zu Problemen führen, da die Zusammensetzung pflanzlicher Inhaltsstoffe oft größeren Schwankungen durch Umwelteinflüsse unterliegt und somit eine gleichbleibende Qualität des Materials nicht gewährleistet sein muss. Das Sammeln von Pflanzen aus natürlichen Beständen birgt auch oft den Nachteil, dass der Bedarf kaum gedeckt werden kann und das Vorkommen der Pflanze bei hohem Bedarf unter Umständen gefährdet ist. Hier hätte die *in vitro* Produktion pflanzlicher Inhaltsstoffe vielfältige Vorteile in ökologischer, ökonomischer und auch politischer Hinsicht (Hahlbrock 1986). Ein solcher Fall ist zum Beispiel die Produktion von Taxol[®] und anderen Taxanen. Die Nachfrage nach Taxol[®], einer Verbindung, die aus der Rinde von *Taxus brevifolia* und anderen *Taxus*-Arten (eine Auflistung von verschiedenen Arten mit Literaturangaben findet sich bei Wickremeshinhe und Arteca (1997)) isoliert werden kann, steigt auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse klinischer Studien gegen verschiedene Krebsarten stetig an. Taxol[®] wurde 1992 zunächst durch die FDA für die Therapie von Eierstock- und Brustkrebs zugelassen. Inzwischen werden aber auch andere Krebsarten mit Taxol[®] therapiert. Taxol[®] greift bei der Zellteilung auf Ebene der Mikrotubulibildung in den Zellzyklus ein und fördert die Bildung ungewöhnlich stabiler und somit funktionsgestörter Mikrotubuli (Herdeg et al. 2000). Dieser Wirkmechanismus unterscheidet Taxol[®] grundlegend von anderen Anti-Tubulin-Drogen wie z.B. Vinca-Alkaloiden, welche die Mikrotubuli-Struktur auflösen (Edelman und Gandara 1996). Leider ist dieser Naturstoff äußerst schwer zu beschaffen. Um 1 kg Taxol[®] zu produzieren, sind 5000 bis 6000 kg Rinde nötig (Wickremesinhe und Arteca 1997), eine enorme Menge, wenn man bedenkt, dass ein 100-jähriges Exemplar von *Taxus brevifolia* etwa 3 kg Rinde liefern kann (Kyriacos et al. 1996). Eine Extraktion aus natürlichem Material kommt somit nur unter Inkaufnahme großer Nachschubschwierigkeiten und deutlichen ökologischen Konsequenzen in Frage, die gegen den Nutzen des Medikamentes aufgewogen werden müssen. Um dieses Dilemma zu lösen, wurden Total- (Holton et al. 1994; Nicolaou et al. 1994) oder Teilsynthesen aus Vorstufen von Taxol[®] entwickelt (Denis et al. 1988; Dutta et al. 1999, Jagtap und Kingston 1999). Ein anderer Ansatz war der Versuch, Pilze (Stierle et al. 1993; U.S. Pat. No.: 5,322,779) oder Bakterien (U.S. Pat. No.: 5561055) Taxol[®] produzieren zu lassen. Der dritte Ansatz, pflanzliche Zellkulturen zur Produktion von Taxol[®] zu nutzen, erscheint zur Zeit am sinnvollsten. Bei Wickremesinhe und Arteca (1997) findet sich eine ausführliche Liste unterschiedlicher aus *Taxus* Spezies angelegter Zellkulturen und der Menge an Taxol[®], die sie produzieren. Die dort beschriebenen Kulturverfahren wurden seitdem noch verbessert und auch an die industrielle Produktion im Großmaßstab angepaßt (Son et al. 2000). Der bisher größte Hersteller von Taxol[®], Paclitaxel und verwandten Substanzen, Bristol-Myers Squibb Company, hat erst kürzlich die Lizenz erworben, mit der Methode der Phyton GmbH, Taxol[®] und verwandte Substanzen mittels Pflanzenzellkulturen zu produzieren und wird voraussichtlich im nächsten Jahr Taxol[®] auf diese Weise herstellen.

Trotzdem ist die kommerzielle Nutzung von pflanzlichen Zellkulturen nicht verbreitet. Außer der Taxol[®]-Produktion existieren nur wenige weitere industriell angewendete Verfahren zur Produktion von pflanzlichen Naturstoffen durch *in-vitro* Kulturen. Dies ist zum einen die Shikoninproduktion mit *Lithospermum erythrorhizon*- sowie die Purpurinproduktion mit *Rubia akane*-Zellkulturen durch Mitsui Petrochemical Ind. Ltd. (Fujita et al. 1982 und persönliche Mitteilung) und zum anderen die Produktion von Ginsenoiden aus *Panax ginseng* durch Nitto Denko Corp. (Ushiyama 1991). Bei den hier aufgeführten Beispielen handelt es sich ausschließlich um in Japan etablierte Prozesse mit Produkten, die eine hohe regionale Bedeutung aufweisen, für den Weltmarkt jedoch eher unerheblich sind. Für die

Produktion anderer pflanzlicher Sekundärstoffe wird der Anbau der Pflanzen bevorzugt, selbst wenn eine Produktion durch *in vitro* Kulturen möglich wäre (Fu et al. 1999). Die Gründe hierfür liegen größtenteils in den hohen Kosten für die Entwicklung, Kontrolle und Wartung von Bioreaktoren (Goldstein 1999). Um die industrielle Produktion für Naturstoffe mittels pflanzlicher Zell- und Gewebekulturen wettbewerbsfähig zu machen, wird es also notwendig sein, die Kosten der Bioreaktortechnologie zu senken. Ein Schritt in diese Richtung sind die Untersuchungen von Hsiao et al. (1999), die sich auf kostengünstigeres Material, Plastik an Stelle von rostfreiem Stahl, beziehen. Weiterhin muss die Produktivität der Kulturen gesteigert werden.

1.5: Coleus blumei



Abb. 2: Habitus von *Coleus blumei*
Aus Kempin 1994

Zum Genus *Coleus* der Lamiaceae gehören mehr als 300 Arten, die in den tropischen und subtropischen Regionen von Afrika, Australien, Ostindien, Malaysia und den Philippinen vorkommen (Lebowitz 1985). In diesen Gebieten werden einige *Coleus*-Arten als Nahrungsmittel, Heil- oder Gewürzpflanzen benutzt (Petersen 1994). In unseren Breiten sind lediglich einige Arten bzw. Varietäten als Zierpflanze, unter dem Namen "Buntnessel", aufgrund ihrer oft sehr bunten Laubblätter, bekannt. Die meisten Pflanzen dieser Gattung sind krautige, mehrjährige Stauden, deren für Lamiaceen typischer viereckiger Stängel durchaus verholzen kann. Die Blätter sind kreuzgegenständig angeordnet und gezähnt. Die Farben der Laubblätter können von grün über gelblich bis dunkelrot variieren und auch mehrere Farben pro Blatt aufweisen. Die Blüten sind blau oder violett und weisen die für Lamiaceen typische zygomorphe Form auf.

Die genaue Nomenklatur für die Art *Coleus blumei* ist, aufgrund einiger

Umbenennungen in der Geschichte dieser Pflanze, nicht vollkommen geklärt (Petersen 1994). Der legitime Name für diese Pflanze lautet nach Bentham *Coleus scutellarioides* (L.), wird allerdings selten verwendet. Da sich die meisten Publikationen auf den Namen *Coleus blumei* beziehen, wird auch hier dieser Name im weiteren verwendet werden.

Alle Pflanzenteile von *Coleus* enthalten Rosmarinsäure, die Gehalte liegen bei der Varietät "Farbenstolz" in den Wurzeln bei 4,3 % und in Stengeln und Blättern bei 1,8 % bezogen auf das Trockengewicht (Szabo 1993).

1.6: Rosmarinsäure produzierende Zellkulturen von *Coleus blumei*

Zellkulturen von *Coleus blumei* sind unter geeigneten Bedingungen in der Lage, deutlich höhere RA-Gehalte zu erreichen, als die Pflanze selbst. Eine normale Kulturperiode dauert für die Suspensionskultur 14 Tage, wobei die maximale Frischgewichtsakkumulation bereits etwa am sechsten Tag erreicht ist. Die Synthese der Rosmarinsäure setzt unabhängig von der aktuellen Zuckerkonzentration im Medium meist dann ein, wenn das Phosphat im Medium zur Neige geht. Dies ist in der Regel am vierten oder fünften Tag der Kulturperiode der Fall (Petersen 1993).



Abb. 3: Zellkulturen von *Coleus blumei* Benth. Rechts die Kalluskultur, links die daraus gewonnene Suspensionskultur. Foto Aus Kempin 1994

Eine Variation der Mediumsparameter, respektive eine Variation des Saccharosegehaltes zwischen 1 und 6 % führt mit zunehmender Saccharosekonzentration zu verstärktem Kulturwachstum und prozentual ansteigendem Rosmarinsäuregehalt (Zenk et al. 1977; Petersen und Alfermann 1988; Gertlowski und Petersen 1993).

Die in unserem Labor verwendeten Suspensionskulturen wiesen diesbezüglich eine Besonderheit auf: Zum einen begann in diesen Kulturen die Akkumulation der Rosmarinsäure erst zum Ende der Wachstumsperiode und zum anderen ließ sich durch eine auf 4 % erhöhte Saccharosekonzentration, die RA-Akkumulation überproportional zur Wachstumsrate des Zellmaterials steigern (Petersen et al. 1993). Durch diese „Stimulierbarkeit“ der RA-Akkumulation und die kurze Kulturperiode erweisen sich diese Kulturen für enzymatische und molekularbiologische Studien als sehr gut geeignet, zumal alle an der RA-Synthese beteiligten Enzyme in der Zellkultur nachgewiesen werden konnten (Petersen et al. 1993, 1994; Petersen 1997).

1.7: Biosynthese der Rosmarinsäure

Die Biosynthese der Rosmarinsäure beginnt mit den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Die ersten Untersuchungen hierzu wurden von Ellis und Towers (1970) mit *Mentha*-Pflanzen durchgeführt. Sie identifizierten durch Fütte-

ungsversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen Tyrosin als Grundlage des 3,4-Dihydroxyphenyllactats und Phenylalanin als Grundlage des Kaffeesäureanteils der Rosmarinsäure.

Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, ist die Rosmarinsäurebiosynthese ein recht kurzer Weg, der insgesamt nur aus acht Enzymen besteht.

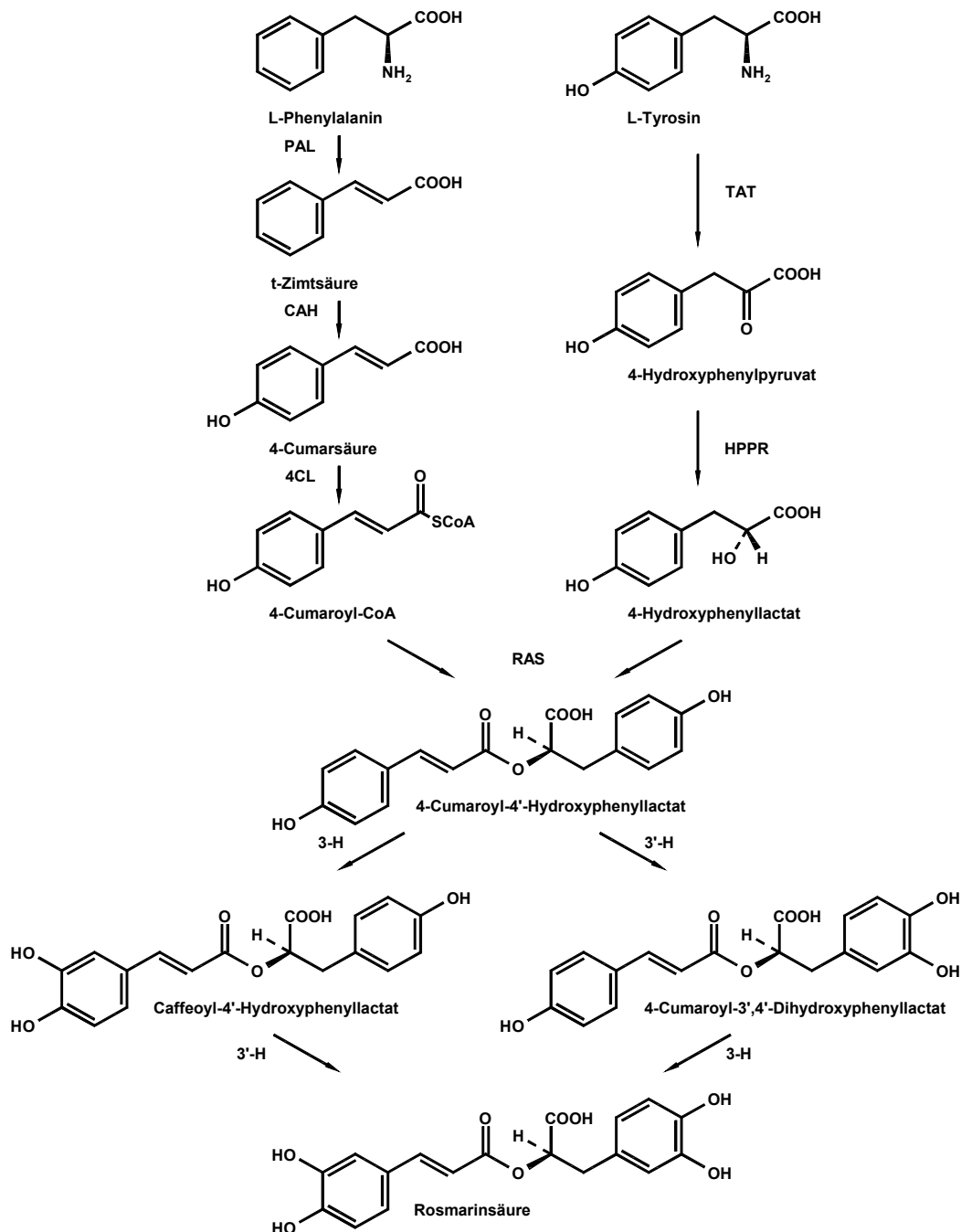


Abb. 4: Biosynthese der Rosmarinsäure

Sie beginnt mit zwei parallel laufenden Wegen, die sich durch die Veresterung der Zwischenprodukte 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat unter Abspaltung von CoA durch die Rosmarinsäuresynthase vereinigen. Das so entstehende 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat wird nun durch zwei weitere Schritte zu Rosmarinsäure hydroxyliert (Petersen et al. 1993; Petersen 1997).

Die einzelnen Enzyme dieses Stoffwechselweges konnten alle aus Rosmarinsäureproduzierenden Zellkulturen von *Coleus blumei*, sowie aus Spross- und Wurzelkulturen derselben Pflanze isoliert werden, ihre Eigenschaften sind weitestgehend bekannt (Petersen et al. 1994).

1.7.1: Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL)

Die PAL ist eines der ersten beschriebenen pflanzlichen Sekundärstoffwechsell-enzyme (Koukol und Conn 1961) und inzwischen sicher das am besten untersuchte. Die PAL katalysiert die Desaminierung von Phenylalanin unter der Bildung von t-Zimtsäure und Ammoniak. Diese Reaktion ist nicht spezifisch für die Rosmarinsäuresynthase, sondern der erste Schritt zu einer Vielzahl von Sekundärstoffen, die ein Phenylpropan-Grundgerüst aufweisen. So beginnt nicht nur die Synthese von Ligninen mit diesem Schritt, sondern auch die Synthese der Flavonoide und Cumarine. Die Reaktion der PAL ist der erste Schritt vom Primärstoffwechsel in den Phenylpropanstoffwechsel.

Bei den meisten bisher untersuchten Pflanzen (z.B. Bohnen, Erbsen, Petersilie, Tomate, *Arabidopsis*) wird die PAL auf DNA-Ebene von einer kleinen Genfamilie von drei bis vier Genen kodiert (Lois et al. 1989, Ohl et al. 1989). In der Kartoffel allerdings ist die Anzahl der Gene ungleich höher (>40) (Joos und Hahlbrock 1992). Bei der PAL aus *Coleus blumei*-Zellkulturen handelt es sich um ein lösliches Enzym, das zwischen 40 und 55 % Sättigung eines Rohextraktes mit Ammoniumsulfat ausfällt. Das Enzym besitzt eine hohe Substratspezifität und ist auch durch hohe Rosmarinsäurekonzentrationen (bis 1 mM) nicht hemmbar (Petersen et al. 1994). Die höchste Aktivität kann in Zellextrakten am sechsten Tag der Kulturperiode in einem Medium mit 4 % Saccharose (CB4) gemessen werden.

1.7.2 Zimtsäure 4-Hydroxylase (CAH)

Die CAH katalysiert die Hydroxylierung von t-Zimtsäure zu 4-Cumarsäure durch die Einführung einer Hydroxylgruppe in den aromatischen Ring. Für diese Reaktion benötigt das membrangebundene, Cytochrom P450-abhängige Enzym, molekularen Sauerstoff und NADPH. Die CAH aus *Coleus blumei* zeigt, wie die PAL, ihre höchste Aktivität in Zellextrakten aus CB4-Medium ebenfalls um den sechsten Kulturtag (Petersen et al. 1993, Karwatzki et al. 1989).

1.7.3: 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL)

Als das letzte Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels konvertiert die 4CL 4-Cumarsäure und andere Hydroxy- oder Methoxy-Derivate der Zimtsäure wie Kaffeesäure, Ferulasäure oder Sinapinsäure in den entsprechenden CoA-Ester. Diese Ester dienen als Substrate für verschiedene Stoffwechselwege, die sich von der Stufe des CoA-Esters ableiten. Aufgrund dieser Position am Ende des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels und der Fähigkeit zur Verwendung vieler miteinander verwandter Substrate, ist es nicht unwahrscheinlich, dass die 4CL bzw. verschiedene 4CL-Isoformen eine Schlüsselrolle in der Regulation der verschiedenen, von dort ausgehenden Wege, spielt. In vielen Pflanzen existieren Isoformen dieses Enzyms, von

denen vermutet wird, dass sie, aufgrund ihrer Fähigkeit verschieden substituierte Hydroxyzimtsäuren verwenden zu können, spezifisch verschiedene Stoffwechselwege ansteuern können (Knobloch und Hahlbrock 1977).

4CL aus *Coleus blumei* ist ebenfalls ein lösliches Enzym, das zwischen 30 und 55 % Sättigung des Rohextraktes mit Ammoniumsulfat ausfällt. Isoformen konnten hier bisher allerdings noch nicht gefunden werden (Petersen et al. 1994; Vetter 1988; Karwatzki 1992). Die 4CL aus *Coleus blumei* akzeptiert verschiedene Zimtsäurederivate, namentlich Zimtsäure, 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure, wobei 4-Cumarsäure das beste Substrat darstellte (Karwatzki 1992). Auch hier wurde die höchste Aktivität am sechsten Tag der Kulturperiode in Zellextrakten aus CB4-Medium gemessen.

1.7.4: Tyrosin Aminotransferase (TAT)

Die Tyrosin Aminotransferase katalysiert die Transaminierung von Tyrosin mit 2-Oxoglutarat als Aminoakzeptor zu 4-Hydroxyphenylpyruvat und Glutamat.

Erstmalig charakterisiert und gereinigt wurden zwei Isoformen des Enzyms aus Suspensionskulturen von *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul und Ellis 1987). Auch in Zellkulturen von *Coleus blumei* ließen sich zwei Isoformen des Enzyms trennen (Kempin et al. 1993).

Die TAT-Aktivität aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei* kann, wie auch die Aktivitäten der CAH und der 4CL, in Korrelation zur Rosmarinsäurebiosynthese nachgewiesen werden. Auch hier tritt die höchste Aktivität in Zellextrakten aus CB4-Medium am 6. Kulturtag auf.

1.7.5: Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR)

Die HPPR katalysiert die Reduktion eines Hydroxyphenylpyruvats zu dem entsprechenden Hydroxyphenyllactat. Sie benötigt dafür NADH oder NADPH. Erstmalig gefunden und beschrieben wurde die HPPR aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei* (Petersen und Alfermann 1988), die endgültige Reinigung steht noch aus.

Auch hier lässt sich eine eindeutige Koordination der Aktivität mit der Rosmarinsäureakkumulation beobachten. Die höchste gemessene Aktivität tritt in Zellextrakten aus CB4-Medium am 6. Kulturtag auf.

1.7.6: Rosmarinsäuresynthase (RAS)

Die von Phenylalanin und Tyrosin ausgehenden Biosyntheseweige liefern die Intermediate der Rosmarinsäurebiosynthese: 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat. Die Zusammenführung dieser Zweige vereinigt diese Vorstufen zu einem Ester. Das Enzym, das diese Esterbildung katalysiert, ist die "Rosmarinsäuresynthase". Der systematische Name dieses Enzyms lautet korrekt Hydroxycinnamoyl-CoA: Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase. Hier wird allerdings weiterhin der Name Rosmarinsäuresynthase verwendet. Sie ist ein für die Rosmarinsäuresynthase spezifisches Enzym.

Die Rosmarinsäuresynthase (RAS) verestert über die aliphatischen Seitenketten 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat (pHPL) zu 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat (pC-pHPL) (Petersen und Alfermann 1988; Petersen 1993). Die RAS akzeptiert außer diesen beiden noch andere Substrate, zum Beispiel Caffeoyle-CoA und 3,4-Dihydroxyphenyllactat (DHPL). In diesem Fall entsteht Rosmarinsäure, die Reaktion, die diesem Enzym ihren Trivialnamen gibt. Untersuchungen ergaben allerdings, dass es sich hierbei wahrscheinlich nicht um die natürlichen Substrate handelt,

da die Affinität der RAS zu 4-Cumaroyl-CoA und pHPL bedeutend höher ist. Dementsprechend entsteht in der Synthese zunächst 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat (Petersen et al. 1993). Die RAS ist ein lösliches Enzym, das sich durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung zwischen 60 und 80 % Sättigung ausfällen lässt. Zur weiteren Reinigung hat sich eine Kombination aus hydrophober Interaktionschromatographie (TSK-Butyl 650) und Affinitätschromatographie (TSK-AF Blue) mit anschließender Auftrennung über ein natives Gel bewährt (Meinhard 1995). Das pH-Optimum der RAS liegt in Standardenzymtests (30 °C) bei 7,0 - 7,5. Halbmaximale Aktivitäten werden unter denselben Bedingungen bei pH 6.5 und pH 8.5 beobachtet. Die RAS ist bei -20 °C ohne messbare Aktivitätsverluste Monate lagerfähig und auch bei 30 °C für mindestens 5 Stunden stabil. Die Reaktionsausbeute der RAS lässt sich durch die Zugabe von 0.5 mM Ascorbat um 50 % und durch die Zugabe von 10 mM DTT um mehr als 600 % steigern. Die RAS-Aktivität ist ferner durch 4-Hydroxymercuribenzoat vollständig zu hemmen, was auf SH-Gruppen im aktiven Zentrum schließen lässt (Petersen 1993).

Untersuchungen im Bezug auf die Hemmbarkeit der RAS durch verschiedene Substrate ergaben, dass sowohl Zimtsäure als auch 4-Cumarsäure und Kaffeesäure die RAS-Aktivität nicht beeinträchtigen. Allerdings ist die RAS durch 4-Hydroxy- und 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat und das S-(-)-Stereoisomer des Hydroxyphenyllactats hemmbar. Ebenfalls liegt eine Hemmung durch Rosmarinsäure (50 % Hemmung bei etwa 700 µM RA) vor. Unter Anwesenheit von freiem CoA, das die RAS -Aktivität ebenfalls stark hemmt, ist die RAS in der Lage, ihre eigene Rückreaktion zu katalysieren, die Esterbindung zu spalten und den Hydroxymethylrest auf CoA zu übertragen. Bei Rosmarinsäure als Substrat entstehen Caffeyl-CoA und 3,4-Dihydroxyphenyllactat (Petersen 1993). Die Reaktion ist für Rosmarinsäure mit einer Konzentration von 50 µM gesättigt, für CoA liegt die Sättigungskonzentration bei 1 mM.

Im Kulturverlauf der Suspensionskulturen von *Coleus blumei* tritt die RAS in ihrer Aktivität ebenfalls korreliert mit der Rosmarinsäureakkumulation auf. Hier sind maximale Aktivitäten in Zellextrakten aus CB4-Medium zwischen dem siebten und neunten Kulturtag messbar (Petersen 1991).

1.7.7: Die 3- und 3'- Hydroxylierung der aromatischen Ringe

Die letzten beiden Schritte in der Biosynthese der Rosmarinsäure werden von zwei membrangebundenen, Cytochrom P450-abhängigen, Hydroxylasen durchgeführt. Sie katalysieren die Hydroxylierungen an Position 3 und 3' der aromatischen Ringe, so dass Rosmarinsäure entsteht (Petersen et al. 1993; Petersen 1997).

1.8: Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, ergänzend zu den bereits unternommenen Untersuchungen zur Rosmarinsäurebiosynthese, die bisher weitestgehend auf enzymatischen und biochemischen Grundlagen basieren, einzelne Gene des Biosyntheseweges zu identifizieren und zu klonieren. Zu diesem Zweck standen heterologe Sonden für einige Enzyme zur Verfügung, mit denen eine cDNA-Bank von *Coleus blumei* durchsucht werden konnte. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, ausgehend von bereits gereinigten Proteinen der Rosmarinsäurebiosynthese, Sonden oder Primer zu erstellen. Mit diesen konnte ebenfalls die cDNA-Bank durchsucht werden oder die Amplifikation eines Abschnittes der gewünschten Gene über PCR angestrebt werden.

2: Material und Methoden

2.1: Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Advantage [®] 2 Taq-Polymerase Mix	Clontech
Alkalische Phosphatase	Roche
Bcu I, Cfr 42 I, Pst I, Sal I	MBI Fermentas
Eco RI, Hind III, Nco I	Roche
HotStar [™] Taq Polymerase	Qiagen
Superscript II reverse Transkriptase	Gibco BRL
RNase, DNase, Proteinase K	Fluka
Taq Polymerase, T4 DNA Ligase, CIP Phosphatase	Promega

2.2: Vektoren und Kits

DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit	Roche
DIG-High Prime	Roche
Dynabeads [®] mRNA DIRECT [™] Kit	Dynal
Hexamerprimer / Oligo-dT(15) Primer	Promega
Omniscript [™] RT Kit	Qiagen
pGEM-T	Promega
pKS ⁻ , pKS II ⁻	Stratagene
SMART [™] RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
ZAP Express [™] cDNA Gigapack [®] III	
Gold Cloning Kit	Stratagene
ZAP Express [™] cDNA Synthesis Kit	Stratagene

2.3: Chemikalien

Acrylamid	Roth
Agarose (low melt)	Biozym
Agarose	Roche
Ammoniumacetat	Merck / Roth
Ammoniumnitrat	Duchefa
Ammoniumperoxydisulfat (APDS)	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Roth
Anti DIG-Fab Fragmente	Roche
Ascorbinsäure	Roth
Borsäure	Roth
1-Butanol	Roth
Bromphenolblau (Na Salz)	Janssen
Caffeoyl-Succinimid-Ester	Petersen / eigene Herstellung
Calciumchlorid	Merck
Caseinhydrolysat	Duchefa
Chloroform	Roth

Coenzym A (freie Säure)	Roche
Coomassie Brilliant Blue G 250	Fluka / Merck
Coomassie Brilliant Blue R	Fluka
Di-Natrium 3-(4-methoxyspiro (1,2-dioxyethan -3,2'- (5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 3,7] decan) -4-yl) phenyl-phosphat = (CSPD)	Roche - Mannheim
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Merck
D-(+)-Maltose	Roth
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Duchefa
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Biomol
DL-p-Hydroxyphenyllactat (pHPL)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure- Natriumsalz (EDTA)	Serva
Eichproteine (für Elektrophorese)	Pharmacia
Eisen-II-Sulfat	Fluka
Essigsäure (Eisessig)	Roth
Ethidiumbromid	Fluka
Fractogel TSK AF Blue	Merck
Fractogel TSK Butyl 650 M	Merck
Gelatine	Merck
Glycin	Duchefa
Hefeextrakt	Duchefa
Indolyl - 3 - Essigsäure (IES)	Duchefa
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Kaffeesäure	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumjodid	Roth
Kaliumnitrat	Duchefa
Kinetin	Duchefa
Kobaltchlorid	Merck
Kupfersulfat	Fluka
Lithiumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Duchefa
Maleinsäure	Sigma
Manganchlorid	Macherey-Nagel
2-Mercaptoethanol	Merck
Polyamid SC 6	Macherey-Nagel
Morpolinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth
myo-Inosit	Serva
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
N,N'-Methylbisacrylamid	Roth
Naphthylessigsäure (NAA)	Duchefa
Natriumacetat	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Duchefa / Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol

Natriummolybdat	Fluka
Natriumsulfat	Merck
Nicotinsäure	Duchefa
N-Laurylsarcosinat	Sigma
Nylonmembranen (positiv geladen)	Roche
NZ-Amine	Otto Aldag
Phenol	Roth
Phenylalanin	Merck
p-Hydroxyphenyllactat	Sigma
Polyclar AT	Serva
Polyethylenglycol - 8000 (PEG 8000)	Fluka
Pyridoxin	Duchefa
Reactive Yellow 86 Agarose	Sigma
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)	Sigma
Röntgenfilm (Lumifilm)	Roche
Saccharose	Nordzucker GmbH
Silbernitrat	Riedel de Haen / Roth
Thiamindichlorid	Duchefa
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Roth
Tween 20	Serva
Blottingpapier	Whatman International Whatman 3 MM, Schleicher & Schuell GB 004 Gel-Blotting Papier
5-Bromo-4-Chloro-3 indolyl	
β-D-Galactopyranosid (X-GAL)	Roth
Zimtsäure	Duchefa
Zinkchlorid	Merck
Zinksulfat	Duchefa

2.4: Geräte und Verbrauchsmaterial

Bakterienschüttler	Gallenkamp
Blotting	PosiBlot [®] Pressure Blotter und Pressure control station Stratagene
Elektroelution	Biotrap Schleicher & Schuell Biotrap BT 1000
Elektrophorese	Power Supply Consort E 835
Entsalzen	Zip-Tip Säulen Millipore, Pharmacia Sephadex G-25 M (PD 10)
FPLC, präparativ	Millipore Waters APPS 650 Detektor Waters 484
Gefriertrockner	B. Braun Biotech, Christ Alpha 1-4
HPLC, analytisch	Kontron Instruments Pumpe 422 Detektor 430 A
Imager System	Raytest
PCR	Stratagene RoboCycler Gradient 96 MJ Research Minicycler
Petrischalen, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen	Greiner

Photometer		Uvikon 930 Kontron Instruments
Pipetten		Pipetman Gilson
Proteinsequenzierung MALDI-TOF		Bruker model Biflex with delayed extraction and reflectron, Scout 26 ion source
	Nano ES	Perkin-Elmer/Sciex model API III+Protana Nanoelectrospray
Rundschüttler (Zellkulturen)		Infors 2K
Sterilbank		Microflow laminar workstation
Ultraschallbad		Bandelin Sonorex Super RK 255
UV-Linking		Stratagene UV- Stratalinker 1800
Wärmeschrank		Jonan
Wasserbäder		Wasserbad Julabo MP
Zentrifugalkonzentratoren		Schüttelwasserbad Julabo SW 20
		Millipore Ultrafree Biomax – 10 K
		NMWL Membran 15 ml Vol
Zentrifugen		Sorvall RC 50 Plus
		Tischzentrifuge Eppendorf
		Sigma 3K 30, Braun Biotech

2.5: Pflanzenmaterial

2.5.1: Suspensionskulturen von *Coleus blumei*

Die während dieser Arbeit verwendeten Suspensionskulturen von *Coleus blumei* wurden alle aus einer Kalluskultur angelegt, die 1979/80 von der Firma Nattermann & Cie, Köln (jetzt Rhone-Poulenc-Rorer) aus Blattstückchen von *Coleus* angelegt und freundlicherweise der Arbeitsgruppe überlassen wurde (Meinhard 1995). Aus diesen im Dauerdunkel kultivierten Kalli wurden 1991 und 1993 die Suspensionskulturen Col. 8 und Col. 16 angelegt, sowie 1996 die Kultur Col. 20 und 1997 die Kultur M1, die ebenfalls im Dauerdunkel auf einem Rundschüttler mit 120 UpM kultiviert werden. Von diesen Kulturen wurde die Kultur M1 zur Erstellung einer cDNA-Bank genutzt. Diese Kultur wurde auch für die in dieser Arbeit durchgeführten Proteinreinigung verwendet.

2.5.2: Kulturmedien

Die Kultivierung der Suspensionskulturen erfolgte in je 50 ml CB-Medium (Petersen und Alfermann 1988) in 250 ml Erlenmeyerkolben, wobei in siebentägigem Rhythmus 20 ml Kultur in 50 ml frisches Medium überführt wurden.

Zusammensetzung des CB-Mediums:

<u>Makroelemente:</u>	KNO ₃		2500	mg/l	
	MgSO ₄	· 7 H ₂ O	250	mg/l	
	NaH ₂ PO ₄	· H ₂ O	172	mg/l	
	CaCl ₂	· 2 H ₂ O	150	mg/l	
	(NH ₄) ₂ SO ₄		134	mg/l	
	FeSO ₄	· 7 H ₂	25.6	mg/l	
	Na ₂ -EDTA		34.3	mg/l	
	<u>Mikroelemente:</u>	H ₃ BO ₃		3	mg/l
		ZnSO ₄	· 7 H ₂ O	3	mg/l
		MnSO ₄	· 5 H ₂ O	1	mg/l
KJ			0.75	mg/l	
Na ₂ MoO ₄		· 2 H ₂ O	0.25	mg/l	
CuSO ₄		· 5 H ₂ O	0.25	mg/l	
CoCl ₂		· 6 H ₂ O	0.25	mg/l	
<u>Hormone:</u>	Kinetin		0.2	mg/l	
	IES		0.5	mg/l	
	2.4-D		2	mg/l	
	NAA		0.5	mg/l	
<u>Vitamine:</u>	Thiamindichlorid		10	mg/l	
	Pyridoxin / HCl		1	mg/l	
	Nicotinsäure		1	mg/l	
<u>weitere Zusätze:</u>	NZ-Amine		2000	mg/l	
	myo-Inosit		100	mg/l	
	Saccharose		20/40	g/l	

Zur Erhaltung der Kulturen wurde das Medium mit 2 % Saccharose (CB2) verwendet. Kulturen die zur Enzymisolierung dienen sollten, wurden in CB-Medium mit 4 % Saccharose (CB4) überimpft, da der erhöhte Saccharosegehalt nicht nur zu höherem Zellwachstum, sondern auch zu verstärkter Bildung von Rosmarinsäure führt.

Alle Komponenten des Mediums wurden in destilliertem Wasser gelöst, auf pH 5.5 eingestellt und in 250 ml Erlenmeyerkolben portioniert. Die Füllmenge betrug pro Kolben 50 ml. Die Kolben wurden mit Zellstoffstopfen verschlossen und für 20 min. bei 121 °C und 1 bar Druck autoklaviert.

2.6: Allgemeine Methoden

2.6.1: DNA und RNA

2.6.1.1: DNA-Isolation aus *Coleus blumei*

Zur Isolierung von DNA aus *Coleus blumei* wurde wegen des hohen Schleim- und Polyphenolgehaltes die CTAB-Methode nach Doyle (1990) leicht verändert angewendet.

In 15 ml des auf 60 °C vorgewärmten CTAB-Isolierungspuffers (4 % (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris - HCl pH 8.0, 0.2 % 2-Mercaptoethanol (v/v)) wurde 1 g in Stickstoff gemörsertes Blatt- oder Zellmaterial von *Coleus* gegeben und unter ständigem Rühren 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischung wurde mit 1 Vol. Chloroform / Isoamylalkohol (24 + 1) extrahiert und im Anschluss zur Phasentrennung für 10 min. bei 1600 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde, um Scherkräfte zu vermeiden, mit Hilfe einer Pipette mit weiter Öffnung in ein SS 34 Zentrifugegefäß transferiert und mit 2 - 3 Vol. kaltem Isopropanol vorsichtig gemischt. Die ausfallende DNA wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette aufgewickelt und in Waschpuffer (76 % Ethanol, 10 mM Ammoniumacetat) transferiert und dort für mindestens 20 min. unter gelegentlichem Schütteln belassen. Alternativ dazu konnte die DNA, sofern sie sich nicht aufwickeln ließ, auch durch 2-minütige Zentrifugation bei 500 g präzipitiert und dann in Waschpuffer übertragen werden. Im Anschluss an die Waschung wurde die DNA entweder erneut aufgespult oder durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 1600 g präzipitiert. In beiden Fällen wurde die nun saubere DNA kurz getrocknet und in TE Puffer (10 mM Tris - HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) rückgelöst.

Um RNA zu entfernen, wurde danach ein 30-minütiger Verdau mit 0.5 µg/ml DNase-freier RNase bei 37 °C durchgeführt und die DNA im Anschluss mit 1/10 Vol 3 M Na-Acetat und 2 Vol Ethanol gefällt.

In wenigen Fällen ergaben sich auch nach dieser Isolation Probleme, die so gewonnene DNA zu verdauen. In diesen Fällen half meist eine zweite Chloroform / Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Fällung.

2.6.1.2: DNA-Isolation aus Lambda -Phagen

Zu 25 ml der gut gewachsenen Bakterien/ λ-Phagen Kultur wurden, um die noch nicht durch die Phagen lysierten Bakterien abzutöten, 100 – 500 µl Chloroform zugegeben und 5 min. geschüttelt.

Zur Phasentrennung wurde im Anschluss 10 min. bei 1727 g und 4 °C zentrifugiert und die wässrige Phase in einen neuen Zentrifugenbecher übertragen. Nach der Zugabe von DNase (Endkonzentration 0.1 µg / ml) und RNase (Endkonzentration 0.5 µg / ml) wurde das Lysat für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde PEG 8000 (Endkonzentration 10 % (w/v)) und NaCl (Endkonzentration 0.5 M) zugegeben und gelöst. Diese Lösung wurde für 1 h auf Eis inkubiert und im Anschluss 20 min. bei 4 °C und 1727 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das weißliche Präzipitat, je nach Größe, durch vorsichtiges auf- und abpipettieren in 300 – 500 µl SM-Puffer rückgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Nach Zugabe von SDS (Endkonzentration 0.1 %) und EDTA (pH 8.0, Endkonzentration 0.01 %) erfolgte eine Inkubation für 30 min. bei 69 °C und eine zweimalige Extraktion mit 1 Vol Phenol-Chloroform, wonach der wässrige Überstand mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 0.6 Volumen Isopropanol versetzt wurde.

Nach einstündiger Inkubation bei -20 °C erfolgte eine Zentrifugation bei 15115 g und Raumtemperatur. Das resultierende Präzipitat wurde dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in Wasser rückgelöst.

2.6.1.3: DNA-Isolation aus Bakterien

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde die bei Sambrook et al. (1989) beschriebene Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) angewendet.

2.6.1.4: RNA-Isolation aus *Coleus blumei*

10 bis 20 g Zellen aus *Coleus blumei* Suspensionskulturen oder eine entsprechende Menge an frischem Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in ein auf 50 °C temperiertes Gemisch aus 25 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris / HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 2 % (w/v) SDS, 10 mM EDTA) und 20 ml mit TE-Puffer gesättigtem Phenol überführt. Die Mischung wurde unter ständigem Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 15 ml Chloroform versetzt und bei Raumtemperatur noch weitere 20 min. gerührt. Im Anschluss daran wurde das Gemisch auf SS 34 Röhrchen aufgeteilt und zur Phasentrennung für 10 min. bei 12000 g zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde noch einmal mit 1 Volumen Phenol / Chloroform extrahiert, zur Phasentrennung unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, danach mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat und 1 Vol. Isopropanol versetzt und für 2 h bei -20 °C inkubiert.

Die so gefällten Nukleinsäuren wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C, 13000 g präzipitiert, kurz getrocknet und anschließend in Boratpuffer (80 mM Tris - Borat pH 8.0, 5 mM EDTA) resuspendiert. Nach der Zugabe von 1/3 Vol. 8 M LiCl wurde das Reaktionsgefäß mit Parafilm verschlossen und über Nacht auf Eis inkubiert.

Um die präzipitierte hochmolekulare RNA zu sedimentieren wurde für 10 min. bei 0 °C und 13000 g zentrifugiert. Das so erhaltene Präzipitat wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in sterilem Wasser rückgelöst.

2.6.1.4.1: mRNA-Isolation aus Gesamt-RNA von *Coleus blumei*

Für die mRNA-Isolation wurde der "Dynabeads[®] mRNA DIRECT™ Kit" benutzt, und die Isolation erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben. Die einzige Abweichung zum Protokoll des Herstellers ergab sich im Denaturierungsschritt der RNA. Hier wurden direkt 50 µl Gesamt-RNA (Konzentration 1 µg / µl) mit 25 µl 2 M LiCl, 10 µl 1 M Tris / HCl pH 8, 2 µl 0.5 M EDTA pH 8, und 13 µl Wasser versetzt und mit den Dynabeads[®] zusammen für 2 min. bei 65 °C inkubiert.

2.6.1.4.2: Entfernen von Polysacchariden aus RNA-Präparationen

Die Polysaccharidfällung erfolgte durch die Zugabe von 50 mM NaCl und 25 % Ethanol (Endkonzentration). Nach der Zugabe des Salzes wurde unter ständigem Schütteln langsam das Ethanol zugetropft und die Mischung danach für 5 min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 9483 g und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltene RNA über Nacht bei -20 °C mit 1/10 Vol. Na-Acetat und 2.5 Vol. Ethanol gefällt

2.6.1.5: Elektrophorese von Nukleinsäuren

2.6.1.5.1 Gele für DNA-Auftrennung nach Größe

Agarosegele wurden für analytische Zwecke, wie die Erfolgskontrolle nach Restriktionsverdau oder PCR-Amplifikationen, für die Untersuchung von DNA-Präparationen auf Degradation oder Kontamination, die Längenbestimmung von Restriktions- oder PCR-Fragmenten, für Southern Blot Analysen sowie für die Abschätzung von DNA-Konzentrationen verwendet. Für präparative Auftrennung von PCR-Fragmenten, DNA-Fragmenten aus Plasmiden oder geschnittene und dephosphorylierte Vektoren, wurden in der Regel "low melt" Agarosegele verwendet.

Die Agarosekonzentration betrug je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente 0.5 - 1 % (w/v). Als Gel- und Laufpuffer wurde TBE Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) verwendet.

2.6.1.5.2 Gele für RNA-Auftrennung nach Größe

Für die RNA-Gelelektrophorese wurden 2.4 g Agarose in 125 ml destilliertem Wasser autoklaviert und nach Abkühlen auf 50 °C mit 40 ml 5 x MOPS-Elektrophoresepuffer (0.1 M MOPS, 40 mM Na-Acetat, 0.5 mM EDTA (pH 8.0)) und 35 ml 37 % igem Formaldehyd versetzt und in die Gelform gegossen. Die RNA wurde mit 2 Vol. frisch angesetztem Probenpuffer (250 µl Formamid, 83 µl 37 % iges Formaldehyd, 50 µl 10 x MOPS-Elektrophoresepuffer und 0.01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und, wenn erforderlich, im Wasserbad bei 65 °C für 10 min. denaturiert. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1 x MOPS-Elektrophoresepuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 5 V / cm Laufstrecke durchgeführt bis die Proben aus den Taschen in das Gel eingelaufen waren. Danach wurde das Gel mit Puffer überschichtet und die Spannung auf 3 V / cm reduziert. Sollte die Elektrophorese über Nacht durchgeführt werden betrug die Spannung 0.5 V / cm Laufstrecke.

2.6.1.6: Isolation von DNA aus Agarosegelen

2.6.1.6.1: DNA-Isolation aus "Low Melt Agarose"

DNA-Fragmente aus PCR-Amplifikationen oder Plasmiden, die in Ligationen oder Markierungsreaktionen eingesetzt werden sollten, wurden elektrophoretisch in "Low-melt Agarose" von der Vektor-DNA, Primern oder der Ausgangs-DNA getrennt und mittels warmer Phenol / Chloroform Extraktion daraus eluiert. Dazu wurde das Gelstück mit der zu eluierenden DNA in ein Eppendorfgefäß gebracht, mit 2 Vol. TE Puffer (10 mM Tris / HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) versetzt und für 15 min. bei 65 °C inkubiert, um die Agarose zu schmelzen. Danach wurde 1 Vol. vorgewärmtes Phenol zugegeben, gemischt und die Mischung bei 15115 g für 5 min. zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde abpipettiert. Die Phenolphase wurde noch einmal mit 1 Vol. TE re-extrahiert und mit der wäßrigen Phase der ersten Extraktion vereinigt. Die vereinigten Phasen wurden mit 1 Vol. Phenol und 1 Vol. Chloroform ausgeschüttelt und erneut zur Phasentrennung zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich kein weißer Niederschlag mehr in der Interphase befand. Danach wurde die wäßrige Phase mit 0.1 Vol. Na-Acetat und 2 Vol. Ethanol versetzt und die DNA durch zweistündige Inkubation bei -20 °C präzipitiert. Diese Methode wurde vor der Klonierung von PCR-Produkten oder aus der cDNA-Bank isolierter DNA angewendet.

2.6.1.6.2: DNA-Isolation durch Elektroelution

Die Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit der „Biotrap[®] BT 1000“ (Schleicher & Schuell) wurde in TE-Puffer exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode wurde vor der Klonierung von PCR-Produkten angewendet.

2.6.1.7: Klonierung und Modifikation von DNA

2.6.1.7.1: Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Spaltungen von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

2.6.1.7.2: Klonieren in Plasmidvektoren

2.6.1.7.2.1: Dephosphorylierung von Vektor DNA (pKS^- und $pKSII^-$)

Die Enden von gespaltenen, zur Ligation vorgesehenen Plasmidvektoren wurden zur Vermeidung von unerwünschten Rezirkularisierungen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA in einem Puffer aus 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM ZnCl und 1 mM MgCl₂ gelöst und mit 1 Unit CIP Phosphatase pro µg DNA versetzt. Der Ansatz wurde 30 min. bei 37 °C inkubiert, erneut mit der gleichen Menge CIP-Phosphatase versetzt und weitere 30 min. bei 37 °C gehalten. Die Lösung wurde danach mit SDS (Endkonzentration 0.5 % (w/v) EDTA (Endkonzentration 10 mM) und Proteinase K (Endkonzentration 20 µg / 100 µl) versetzt und bei 56 °C für 30 min. inkubiert. Danach wurde zweimal mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert und die Plasmid-DNA mit 2 Vol. Ethanol und 0.1 Vol 3 M Na-Acetat gefällt.

2.6.1.7.2.2: Ligieren von PCR-Fragmenten in $pGEM^{\text{®}}-T$

Der $pGEM^{\text{®}}-T$ Vektor nutzt das Prinzip einiger Taq Polymerasen aus, am 5'-Ende der amplifizierten Sequenz die Base Adenosin zu addieren. Durch ein an das jeweilige 3'-Ende des Vektors angehängtes Thymidin wird nun ein sogenanntes „klebriges“ Ende (sticky end) simuliert, welches das direkte Klonieren von PCR-Produkten im Gegensatz zur Klonierung mit glatten Enden (blunt End) erleichtert. Die $pGEM^{\text{®}}-T$ Vektoren wurden vom Hersteller bereits geschnitten geliefert und mussten auf Grund der an beiden 3'-Enden der Schnittstelle angehängten Thymidine und der somit sehr geringen Wahrscheinlichkeit zur Selbstligation nicht dephosphoryliert werden. Zur Ligation wurden der Vektor und das zu klonierende, über Gelelektrophorese gereinigte PCR-Produkt im Verhältnis 1:5 eingesetzt.

Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers der Ligase bei 8 °C über Nacht durchgeführt.

2.6.1.7.2.3: Ligieren von DNA-Fragmenten in pKS^- und $pKSII^-$

Ligationen in pKS^- und $pKSII^-$ wurden im Verhältnis 1:2 von Vektor zu Fragment durchgeführt. Die durch PCR erhaltenen Fragmente wurden mit Hind III verdaut und über Gelelektrophorese gereinigt. Die Ligation fand über Nacht bei 10 °C statt. Für die Ligationsreaktion wurden Fragment, Vektor, Puffer und T4 DNA-Ligase auf Eis zusammenpipettiert. Die eingesetzte Menge an T4-Ligase betrug 1 U / 2 µg DNA im Ansatz.

2.6.1.8: Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen2.6.1.8.1: Southern Blot

Der Kapillartransfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten auf positiv geladene Nylonmembranen der Firma Roche erfolgte nach Southern (1975). Hierfür wurde das Gel zur Spaltung größerer Fragmente zunächst für 10 min. in 2 Vol. (bezogen auf das Gelvolumen) 0.25 M HCl inkubiert. Die Säure wurde danach abgossen und nach kurzem Spülen mit demin. H₂O durch 2 Vol. Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 0.6 M NaCl) ersetzt. Auch in dieser Lösung wurde das Gel 10 Minuten inkubiert, der Vorgang wurde nach Erneuern der Lösung wiederholt. Danach erfolgte nach erneutem kurzem Spülen des Gels mit demin. H₂O die Neutralisierung durch 10-minütiges Schütteln mit 2 Vol. 3 M NaCl, 0.5 M Tris / HCl, pH 7.5. Danach wurde die DNA mittels Kapillartransfer mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 7.0) für mindestens 16 Stunden auf Nylonmembranen der Firma Roche transferiert. Die DNA wurde anschließend mittels UV-Licht (UV Stratalinker 1800, 120 mJoule, 4 min) auf der Membran fixiert.

2.6.1.8.2: Northern Blot

Formaldehydgele wurden nach dem Lauf für 30 min. in 0.05 M NaOH, 0.15 M NaCl sanft geschüttelt, um Formaldehyd zu entfernen und den Transfer der RNA zu erleichtern. Im Anschluss daran wurden die Gele für weitere 30 min. in 0.1 M Tris / HCl, pH 7.5 und 0.15 M NaCl neutralisiert und danach 30 min. in 20 x SSC inkubiert.

Für den Transfer der RNA auf Nylonmembranen wurde ein PosiBlot[®] Pressure Blotter (Stratagene) verwendet und die Blottingprozedur nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.1.8.3: Dot- und Slot Blot Transfer

DNA wurde für 5 min. in Denaturierungslösung (0.4 M NaOH, 0.6 M NaCl) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einer "Dot Blot Apparatur" mit einer Geschwindigkeit von ca. 100 µl / min. durch eine positiv geladene Nylonmembran der Firma Roche gesaugt. Die Membranen wurden nach dem Transfer 1 min. in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.2 neutralisiert und getrocknet.

Für Slot Blots mit RNA wurden 10 µg Gesamt-RNA (oder 1 µg polyA⁺ RNA) in 10 µl Wasser gelöst und mit 20 µl 100 % Formamid, 7 µl 37 % Formaldehyd und 2 µl 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat pH 7.0) versetzt. Die Mischung wurde für 15 min. bei 68 °C inkubiert und im Anschluss sofort auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 2 Vol. 20 x SSC wurden die Proben in einer Slot Blot Apparatur mit einer Geschwindigkeit von maximal 100 µl / min. durch eine positiv geladene Nylonmembran gesaugt, die zuvor in sterilem Wasser und danach in 20 x SSC eingelegt wurde. Nicht verwendete Slots wurden während der Prozedur mit 10 x SSC gefüllt.

DNA sowie RNA wurden anschließend mittels UV-Licht (UV Stratalinker 1800, 120 mJoule, 4 min) auf der Membran fixiert.

2.6.1.9: Markierung von DNA-Fragmenten

Es gibt generell mehrere Möglichkeiten, Nukleinsäuren zu markieren und zu detektieren. Enzymatische Markierungsreaktionen erreichen dabei die höchste Sensitivität. Die hier am häufigsten verwendeten Methoden sind: „Nick-Translation“, „Primer-Extension“, wozu auch das „random priming“ gehört und der Einbau von markierten

Nukleotiden über PCR. Ebenfalls möglich ist es, markierte Nukleotide an das Ende des zu markierenden DNA-Stückes anzuhängen, was dann im Falle von mehreren Nukleotiden als „tailing“ und im Falle von einem markierten Nukleotid als „end-labeling“-End-Markierung- bezeichnet wird.

Während sich die Methode des „random priming“ und die der „nick-translation“ eher für längere DNA-Stücke ab etwa 100 bp eignen, eignet sich die Methode der End-Markierung oder die des "tailing" vornehmlich für kürzere DNA-Stücke.

Das DIG-System (Roche) basiert auf der Grundlage des Einbaus von DIG (Digoxigenin), in Form von DIG-(11)-dUTP (Abb. 5), in die DNA.

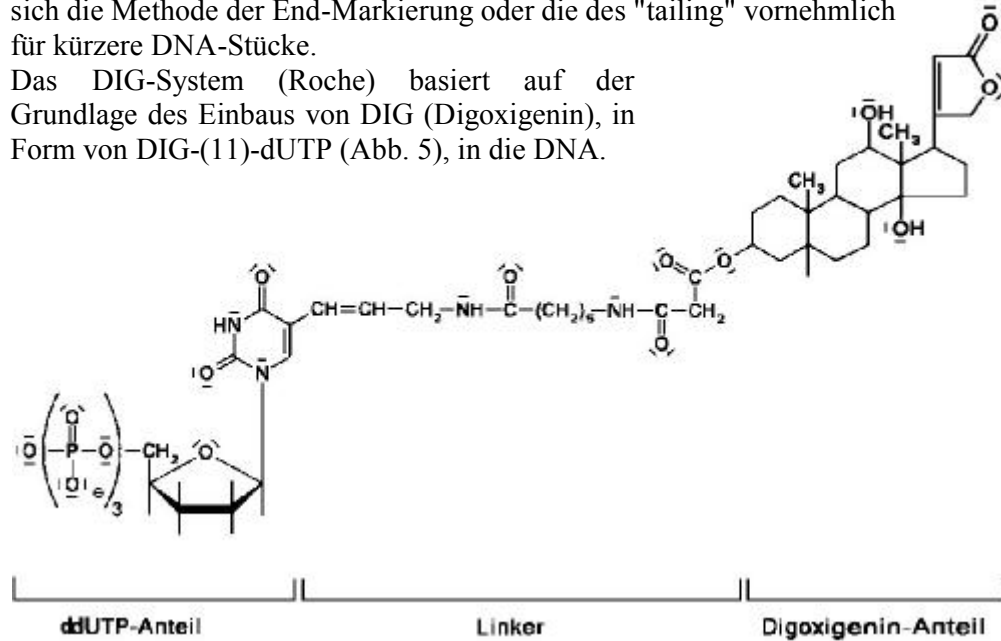


Abb. 5: DIG-ddUTP. Aus: "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" Roche

Dies geschieht mit denselben Methoden, die auch für die Inkorporation von isotoopenmarkierten Nukleotiden verwendet werden.

Detektiert wird die so markierte DNA über ein Konjugat aus Alkalischer Phosphatase und einem Anti-Digoxigenin Antikörper (Abb. 6). Die Alkalische Phosphatase ist in der Lage, mit einem Substrat, CSPD, zu reagieren (Abb. 7) und so eine Chemilumineszenz hervorzurufen, die auf einem Röntgenfilm Schwärzung bewirkt.

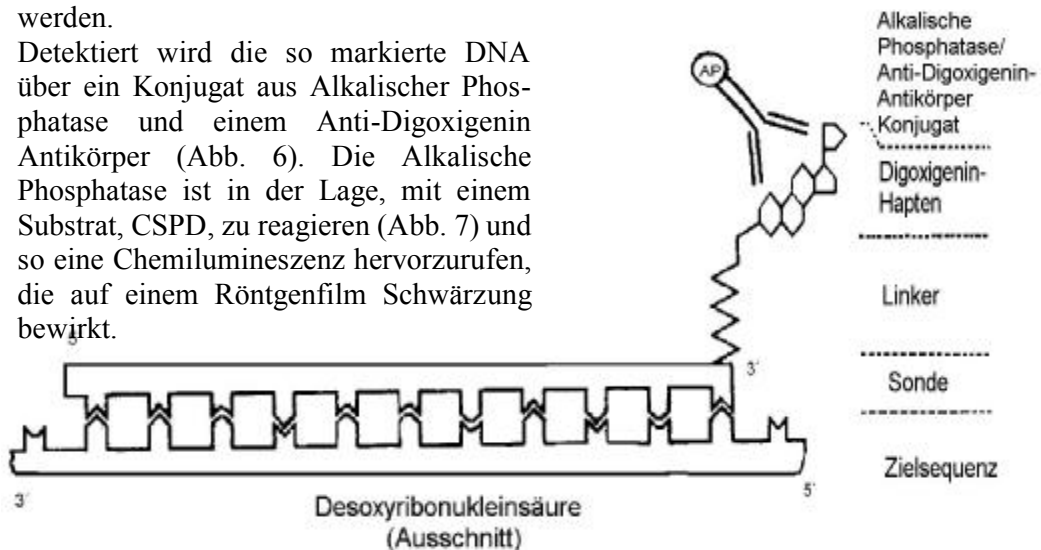


Abb. 6: Nachweis digoxigenerter DNA mit einem Antikörper-Konjugat. Aus: Herder, Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, 1995)

bei 37 °C inkubiert. Zum Beenden der Markierungsreaktion wurden sodann 3 µl 200 mM EDTA pH 8.0 zugegeben und das Reaktionsgefäß auf Eis plaziert.

2.6.1.10: Filterhybridisierung von DNA-Fragmenten:

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsarten wurden folgende Puffer verwendet:

Hybridisierungspuffer für DNA / DNA Hybridisierungen:

5 x SSC (0.75 M NaCl,
7.5 mM Na-Citrat (pH 7))
1 % (w/v) N-Laurylsarcosinat
0.02 % (w/v) SDS
2 % Blockierungsreagenz

Hybridisierungspuffer für RNA / DNA Hybridisierungen:

5 x SSC (0.75 M NaCl,
7.5 mM Na-Citrat (pH 7))
0.1 % (w/v) N-Laurylsarcosinat
7 % (w/v) SDS
2 % Blockierungsreagenz
50 % (v/v) Formamid
50 mM Natriumphosphat-Puffer
pH 7.0

2.6.1.10.1: DNA / DNA- sowie DNA / RNA-Hybridisierung

Die Membranen mit der fixierten DNA wurden für mindestens 1 h in der entsprechenden Hybridisierungslösung ohne Sonde vorhybridisiert. Die markierte Sonde wurde für 10 min. im kochenden Wasserbad denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und zum Ende der Vorhybridisierungszeit der Hybridisierungslösung zugegeben. Die Temperaturen für die Vorhybridisierung sowie für die Hybridisierung betragen hierbei für die PAL 60- 68 °C, für die 4CL 50- 60 °C und für die RAS 37- 40 °C. Hybridisiert wurde über Nacht bei gleichbleibender Temperatur im Schüttelwasserbad. Die Hybridisierungslösungen, denen die Sonde zugegeben worden war, wurden bis zu zehnmal wiederverwendet und jeweils vor der Hybridisierung zum Denaturieren der Sonde für 10 min. im kochenden Wasserbad erhitzt.

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Membranen bei Hybridisierungstemperatur je zweimal für 5 min. in 2 x SSC, 0.1 % SDS und zweimal in 0.5 x SSC, 0.1 % SDS gewaschen.

2.6.1.11: Detektion von an Filter gebundenen Nukleinsäuren

Um gebundene Sonden erkennen zu können, wurden die Membranen nach der Hybridisierung zunächst für 1 min. in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0.3 % Tween 20, pH 7.5 (20 °C)) äquilibriert und danach in Blockierungspuffer (Maleinsäurepuffer ohne Tween aber mit 1 % (w/v) Blockierungsreagenz) übertragen. Die im Kit mitgelieferten Anti-Digoxigenin-Antikörper (750 U / ml Anti-DIG, Fab Fragmente verbunden mit alkalischer Phosphatase) wurden 1:10000 verdünnt und nach 30 min. in der Menge von 1 µl / 10 ml Lösung der Blockierungslösung zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug hier abweichend zum von Roche vorgeschlagenen Protokoll 60 min. Die mit Antikörpern versetzte Blockierungslösung wurde bei 4 °C gelagert und bis zu zehnmal wiederverwendet.

Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Filter für 2 x 15 min. in Maleinsäurepuffer gewaschen und danach in Detektionspuffer (100 mM Tris / HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5 (20 °C)), bei DNA / DNA-Bindungen abweichend vom Originalprotokoll zweimal für je 5 min. inkubiert. Die Membranen wurden im Anschluss

nach kurzem Abtropfen in CSPD-Lösung (0.25 mM in Detektionspuffer) überführt, 2 min. inkubiert und dann nach kurzem Abtropfen in Plastikfolie eingeschlagen. Nach Auflegen des Röntgenfilms (Lumifilm – Roche) wurden die Membranen zur Belichtung des Filmes je nach Intensität des Signals 1-4 h bei 37 °C inkubiert.

Für die Quantifizierung von Lumineszenzsignalen wurden die in Plastikfolie eingeschlagenen Membranen für 15 min bei 37 °C vorinkubiert und das Signal dann mit dem Bioimager (Raytest) ausgewertet

2.6.1.12: Entfernen von Sonden von der Membran (stripping)

2.6.1.12.1: Befreien der Membran von DNA-Sonden bei Hybridisierung mit DNA

Zum Entfernen des Chemilumineszenzsubstrates wurden die Membranen zunächst für 2 x 1 min. in destilliertem Wasser unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran wurden sie in auf 37 °C erwärmte „Stripping“ Lösung (0.2 M NaOH, 0.1 % SDS) überführt und 2 x 10 min. bei 37 °C unter lebhaftem Schütteln inkubiert. Die so von der Markierung befreiten Membranen wurden kurz mit 2-fach konzentriertem SSC abgespült und danach bis zur weiteren Verwendung in 2-fach konzentriertem SSC aufbewahrt.

2.6.1.12.2: Befreien der Membran von DNA-Sonden bei Hybridisierung mit RNA

Zum Entfernen von DNA-Sonden von Northern- oder RNA-Dot-Blots wurde 0.1 % ige SDS Lösung zum kochen gebracht und über die zu behandelnde Membran gegossen. In dieser Lösung wurde die Membran ohne weiteres Erwärmen 10 min. lebhaft geschüttelt und danach für 5 min. in Maleinsäurepuffer inkubiert. So behandelte Membranen wurden bis zur nächsten Hybridisierung in 2-fach konzentriertem SSC aufbewahrt.

2.6.2: Proteine

2.6.2.1: Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 reagiert hauptsächlich mit Arginin-Resten und im geringeren Ausmaß mit Tyrosin-, Tryptophan-, Histidin-, Phenylalanin-, Lysin- und Alanin-Resten. Die Bindung erfolgt über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen (Compton und Jones 1985). Es kommt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des freien Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm im Protein-Farbstoff-Komplex.

Zur Herstellung der Bradford-Lösung wurden 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 12.5 ml 96 % Ethanol p.a. und 85 % o-Phosphorsäure gelöst. Die Lösung wurde mit bidest. Wasser auf 250 ml aufgefüllt und zweimal filtriert. 2 ml der Bradford-Lösung wurden mit einer geeigneten Menge, in der Regel 10 µl der zu testenden Probe, in Plastikküvetten gemischt. Nach 20 min. wurden die Proben gegen einen Leerwert (entsprechende Menge Puffer statt Proteinlösung) bei 595 nm photometrisch vermessen. Zur Quantifizierung diente ein BSA-Standard (Rinderserumalbumin, 1 mg/ml). Es wurden jeweils Doppelproben bestimmt.

2.6.2.2: Elektrophorese von Proteinen

2.6.2.2.1: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS -PAGE)

Die SDS-PAGE wurde, wie von Meinhard (1995) beschrieben, nach Lämmler (1970) durchgeführt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergens. Durch die Einwirkung von SDS kommt es zur Entfaltung der Proteine, wobei deren Ladungen durch die stark negative Ladung des SDS überdeckt werden. SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol oder DTT und unterbindet Quartärstrukturen. Die Proteine besitzen bei dieser Methode ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis und werden nach ihrer Molekularmasse getrennt. Die Verwendung von geeigneten Marker-Proteinen ermöglicht eine Bestimmung der relativen Molekularmasse. Bei der SDS-Gelelektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrer Größe und ihrer Molekularmasse auf.

2.6.2.2.2: Probenbehandlung:

Jeweils vier Volumenteile Probe wurden mit einem Volumenteil 5x Probenpuffer versetzt und in kochendem Wasser 2 min. denaturiert.

5x Probenpuffer: 1 g SDS
 1.65 ml 1.9 M Tris / HCl pH 6.8
 2.50 ml β-Mercaptoethanol
 5.75 ml Glycerin
 0.10 ml 1 % Bromphenolblau

Als Molekularmassen-Standards wurden LMW-Marker (low molecular weight marker von Pharmacia) verwendet:

Phosphorylase b	94000 Da
Rinderserumalbumin	67000 Da
Ovalbumin	43000 Da
Carboanhydrase	30000 Da
Trypsin-Inhibitor	20100 Da
α -Lactalbumin	14400 Da

Die Proteinmischung (600 μ g) wurde in 2 ml bidest. Wasser gelöst, mit 0.5 ml Probenpuffer versetzt, durch 2-minütiges Kochen denaturiert und in Aliquots von je 25 μ l eingefroren.

2.6.2.2.3: Acrylamid-Gele:

Für die Elektrophorese wurde ein Vertikalsystem verwendet. Die Trenngele waren 18 x 12 x 0.15 cm groß und wurden mit einem ca. 4 cm hohen Sammelgel zur Konzentrierung der Proben überschichtet.

Der Acrylamidgehalt des Trenngels lag bei 10 %, der des Sammelgels bei 5 %. Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Trenngel		Sammelgel
10 ml	1.5 M Tris / HCl pH 8.8	—————
—————	0.5 M Tris / HCl pH 6.8	2.5 ml
0.2 ml	20% SDS	0.1 ml
13.3 ml	30% Acrylamid / 0.8% Bisacrylamid	3.3 ml
0.2 ml	5% TEMED	0.1 ml
15.9 ml	bidest. Wasser	13.4 ml
0.4 ml	3% Ammoniumperoxydisulfat	0.6 ml

Tab. 1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE

Die Trenngelkomponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge unter Rühren zusammenpipettiert und im Anschluss direkt mit einer Pasteurpipette zwischen die Glasplatten gefüllt. Die Gele wurden mit 0.1 % SDS überschichtet, um den Einfluss von Luftsauerstoff auf die Polymerisation zu unterbinden und um eine glatte Oberfläche zu erreichen. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels, wurde das SDS durch mehrmaliges Spülen mit bidest. Wasser entfernt. Das Sammelgel wurde in gleicher Weise darüber gegossen.

2.6.2.2.4: Elektrodenpuffer und Elektrophorese

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die mit vorgekühltem Elektrophoresepuffer gefüllt wurde. Daraufhin wurden die Proteinproben in die Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte mit konstanter Stromstärke (30 mA) bei Raumtemperatur.

Kathodenpuffer: 0.025 M Tris, 0.192 M Glycin, 0.1 % SDS

Anodenpuffer: 0.025 M Tris / HCl pH 8.3

2.6.2.3: Färbemethoden für Proteine in Gelen

2.6.2.3.1: Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet Ag^+ Komplexe mit den Resten der Aminosäuren Glu, Asp und Cys. Durch die Zugabe von Formaldehyd wird das Ag^+ in den Komplexen zu Ag reduziert.

Hier wurde die Färbemethode nach Blum et al. (1987) verwendet. Die Lösungen wurden stets vor Gebrauch frisch angesetzt. Das zu färbende Gel wurde nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

1. Fixierbad: 100 ml Methanol, 24 ml Essigsäure, 100 μl 37 % Formaldehyd, bidest. Wasser ad 200 ml. Dauer: Über Nacht
2. Waschen: 30 % Ethanol, je 200 ml, Dauer: 3 x 20 min.
3. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (40 mg / 200 ml), Dauer: 1 min.
4. Waschen: bidest. Wasser, Dauer: 3 x 20 sec
5. Imprägnierbad: 0.3 g AgNO_3 , 122 μl 37 % Formaldehyd, bidest. Wasser ad 150 ml. Dauer: 1-1.5 h
6. Waschen: bidest. Wasser, Dauer: 2 x 20 sec
7. Entwickeln: 12 g Na_2CO_3 , 100 μl 37 % Formaldehyd, 4 ml der Lösung aus Schritt 3, bidest. Wasser ad 200 ml. Dauer: 3-10 min
8. Waschen: bidest. Wasser, Dauer: 1 x 20 sec
9. Stoppen: 100 ml Methanol, 24 ml Essigsäure, bidest. Wasser ad 200 ml, Dauer: 10 min
10. Waschen: 30 % Methanol, Dauer: 30 min.

2.6.2.3.2: Färbung nach Coomassie

Hier wurde eine spezielle Methode nach P. Hunziker (Biochemisches Institut der Universität Zürich, Schweiz) verwendet, um die Proteine im Gel für die nachfolgende Sequenzierung zu schonen. Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele für 30 min. in eine Färbelösung, bestehend aus 0.15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250, 0.5 % (v/v) Essigsäure und 10 % (v/v) Methanol, gegeben. Anschließend wurden die Gele in einer Lösung aus 5 % (v/v) Essigsäure und 10 % (v/v) Methanol so lange entfärbt, bis man die Banden deutlich sehen konnte.

2.6.2.4: Proteinsequenzierung

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden im Biochemischen Institut der Universität Zürich, Winterthurerstraße. 190, CH-8057 Zürich (Schweiz) unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Hunziker und Mitarbeitern durchgeführt

2.6.2.4.1: Tryptischer Verdau

Diese Methode wird benutzt, um Proteine in Acrylamid-Gelen zu verdauen und sie so auf eine anschließende Sequenzierung vorzubereiten. Zunächst wurde das Protein enthaltende Gelstück ausgeschnitten und in 250 μl eines Puffers aus 0.5 M Tris pH 8.2 und 50 % Acetonitril zerdrückt. Nach 45 minütiger Inkubation bei 30 °C und anschließender kurzer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Prozedur wiederholt. Danach wurde das Gel mit dem Protein vollständig in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe des Verdauungspuffers (0.5 μg Trypsin / 10 μl , 2 mM CaCl_2 , 50 mM Tris pH 8.2) in 5 μl Schritten zum Gel, bis es vollständig aufgequollen war. Das so gequollene Gelstück wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden eventuell überschüssige Pufferreste entfernt. Im Anschluss daran erfolgte eine zweimalige Extraktion der

Peptide in 150 μ l 0.1 % TFA / 60 % Acetonitril für je mindestens 15 min. bei Raumtemperatur. Die Überstände wurden in der Vakuumpzentrifuge bis zur Trockene eingengt.

2.6.2.4.2: Entsalzen der Peptide

Will man mit den Peptiden, die durch den tryptischen Verdau gewonnen wurden, im Anschluss massenspektrometrische Untersuchungen durchführen, müssen sie entsalzt werden. Dies geschah mit ZipTip Säulen der Firma Millipore.

2.6.2.4.3: MALDI-TOF

Generell werden bei der Massenspektrometrie Moleküle als Ionen in der Gasphase untersucht. Moleküle, die untersucht werden sollen, müssen also zunächst in die Gasphase gebracht werden. Dies kann zum Beispiel durch den Beschuss mit einem Laser geeigneter Wellenlänge geschehen, der die Probe zum Verdampfen bringt und die darin enthaltenen zu analysierenden Moleküle ionisiert.

Unter MALDI-TOF (Matrix unterstützte Laserdesorptions/ionisations–Massenspektroskopie) versteht man eine besondere Art der Massenspektroskopie, bei der die Probe in eine geeignete Matrix, bestehend aus kleinen organischen Molekülen, eingebettet wird, die bei der entsprechenden Laser-Wellenlänge eine hohe Absorption zeigen. Auf diese Weise erhält man höhere Intensitäten der Analytmolekül-Ionen und fast keine Fragment-Ionen. Mit dieser Methode kann man auch größere Moleküle, wie z.B. Proteine, nachweisen. Bei der von uns verwendeten Matrix handelte es sich um α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, die in destilliertem Wasser mit 50 % Acetonitril vorlag. Diese wurde mit dem entsalzten Protein gemischt und auf einen Träger aufgebracht, auf dem das Gemisch nach Verdampfen des Lösemittels kristallisierte.

Bei den für die MALDI eingesetzten Massenanalysatoren handelt es sich um Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-time of flight), bei denen die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit erfolgt, die zwischen dem Start der Ionen von der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht.

2.6.2.4.4: Nano-ES

Bei der Nano-ES (Nano-Elektrospray-Methode) wird die Ionisierung der zu analysierenden Moleküle nicht durch Laserbeschuss erzielt, sondern durch das Versprühen der Probe in einem Lösungsmittel innerhalb eines starken elektrischen Feldes.

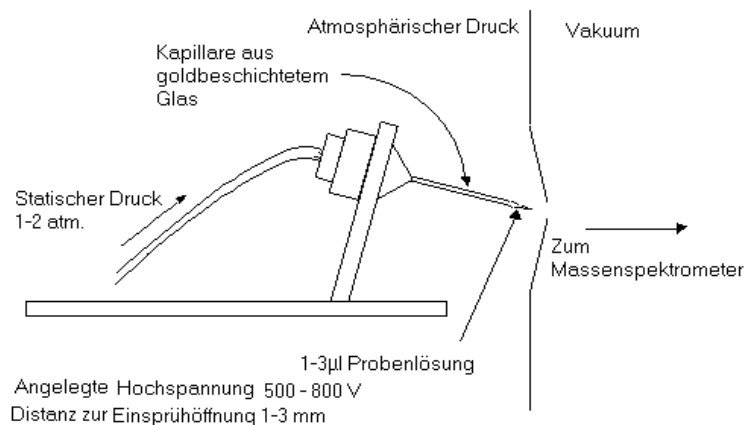


Abb. 8 Aufbau der Einspritzvorrichtung der Nano-ES

Um ein solches Spray zu bekommen, wird die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel in eine goldbeschichtete Kapillare gefüllt, wie in Abbildung 8 dargestellt. Durch das Anlegen einer Spannung an diese Kapillare, wird die Probe als feine, geladene Tröpfchen ausgestoßen. Das Lösungsmittel, das die Analytmolekül-Ionen umgibt, wird sodann, zum Beispiel durch Wärme, dazu gebracht zu verdunsten. Die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche nimmt zu, was letztendlich dazu führt, dass die Ionen aus dem Tröpfchen heraus in die Gasphase übergehen. Die so entstandenen Ionen werden dann fokussiert in einen Massenanalysator geleitet. Die Technik der Nano-ES ermöglicht lange Messzeiten mit sehr geringen Proben volumina und Mengen (etwa 30 min./ μ l), was diese Technik zur Sequenzierung kleinerer Proteinmengen geeignet macht.

2.6.3 Phagen und Bakterien

2.6.3.1: Medien für die Bakterienanzucht:

LB- Medium:	10 g / l Caseinhydrolysat
	5 g / l Hefeextrakt
	10 g / l NaCl, pH 7.0 mit NaOH
SOB- Medium:	20 g / l Caseinhydrolysat
	5 g / l Hefeextrakt
	0.5 g / l NaCl, pH 7.0 mit NaOH

Sollte die Anzucht auf festem Medium erfolgen, wurden 13 g Micro-Agar vor dem Autoklavieren auf einen Liter Medium zugegeben. Das heiße Medium wurde vor dem Gelieren auf Kulturschalen verteilt. Bei der Zugabe von Antibiotika zu den Medien muss darauf geachtet werden, dass die Mediumstemperatur 50 °C nicht überschreitet. Wurden Medien mit Ampicillin hergestellt, betrug die verwendete Ampicillinkonzentration 50 µg / ml. Bei Medien mit Tetracyclin als Antibiotikum betrug die verwendete Antibiotika-Konzentration ebenfalls 50 µg / ml.

2.6.3.2: Anzucht von Bakterien

2.6.3.2.1: Anzucht auf Platten

Für die Anzucht von Bakterien auf Kulturplatten wurden 20 µl einer Stammkultur auf entsprechendem Medium mit Hilfe eines sterilen Glasstabes ausgestrichen. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und im Kulturschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.6.3.2.2: Anzucht in flüssigem Medium

Für die Anzucht in flüssigem Medium wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers eine einzelne Kolonie oder wenige Kristalle einer gefrorenen Stammkultur in einen Kolben oder ein Reagenzglas überführt und im Rundschüttler bei 250 UpM und 37 °C inkubiert, bis die gewünschte optische Dichte von 0,5-1 bei 600 nm (OD₆₀₀) erreicht war.

2.6.3.2.3: Anzucht von Wirtszellen für Lambda-Phagen

Um Wirtszellen, mit denen man Lambda Phagen optimal plattieren kann, zu erhalten, wurde der dem jeweiligen Phagenstamm entsprechende Bakterienstamm in 25 ml LB-Medium mit 0.2 % Maltose angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0.5 wurden die Bakterien durch zehnmünütige Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C sedimentiert und nach Abgießen des Mediums in 7.5 ml eiskaltem 10 mM MgSO₄ resuspendiert.

2.6.3.3: Aufbewahrung von Bakterien

2.6.3.3.1: Herstellen von Glycerol-Stammkulturen

Hierfür wurden die entsprechenden Bakterienkolonien zunächst mit einem sterilen Zahnstocher in entsprechendes Medium überführt und auf dem Rundschüttler bei 37 °C und 120 UpM bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0.5 inkubiert. Zu 0.85 ml dieser Kultur wurden 0.15 ml steriles Glycerol gegeben und gründlich vermischt. Die

mit Glycerol versetzte Bakterienkultur wurde danach direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und längerfristig bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6.3.3.2: Herstellung gefrierkompetenter Bakterien

Um gefrierkompetente Bakterien herzustellen, wurde eine einzelne Kolonie des Stammes *E. coli* DH5 α in einen Kolben mit 50 ml SOB Medium, versetzt mit 20 mM MgSO $_4$, gebracht und bis zum Erreichen einer OD $_{600}$ von ca. 0.5 im Rundschüttler bei 120 UpM und 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurden die Bakterien in ein vorgekühltes, steriles Zentrifugenglas überführt und 10 min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 1727 g für 10 min. bei 4 $^{\circ}\text{C}$ sedimentiert, der Überstand entfernt und das Bakteriensediment in 20 ml FSB resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 4 ml eisgekühltem FSB (10 mM K-Acetat pH 7.5, 45 mM MnCl $_2$, 10 mM CaCl $_2$, 100 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerol) durch vorsichtiges Schütteln rückgelöst. Nach der Zugabe von 140 μl DMSO wurde die Suspension kurz durch Umschwenken gemischt und dann erneut im Eisbad inkubiert. Aliquots dieser Suspension (150 μl) wurden nun in sterile Eppendorfgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so behandelten Bakterien wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6.3.4: Transformation von Bakterien

Die Transformation gefrierkompetenter *E. coli* DH5 α erfolgte nach Hanahan (1985). Hierzu wurden max. 10 μl Volumen und max. 10 ng DNA, bezogen auf den Vektor, zu 150 μl Aliquots auf Eis aufgetauter, gefrierkompetenter Bakterien pipettiert, durch vorsichtiges Schütteln sanft gemischt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für 90 Sek. bei 42 $^{\circ}\text{C}$. Danach wurden die Bakterien sofort für 2 min. in ein Eisbad gestellt und mit 800 μl SOB Medium versehen. Die Bakterien wurden dann im Rundschüttler bei 250 UpM und 37 $^{\circ}\text{C}$ für 1 h inkubiert und im Anschluss auf Indikatorplatten (LB, Ampicillin (50 μg / ml), IPTG (60 μg / ml), X-Gal (60 μg / ml)) in Aliquots von je 100 μl ausplattiert.

2.6.3.5: Anzucht von Phagen

2.6.3.5.1: Anzucht in flüssigem Medium

Die dem jeweiligen Phagentyp entsprechenden Wirtsbakterien wurden in je 25 ml LB-Medium (10 g / l NaCl, 10 g / l Caseinhydrolysat, 5 g / l Hefeextrakt, pH 7.3), das kurz vor der Verwendung mit 0.2 % (w/v) Maltose aus einer sterilfiltrierten Stammlösung versetzt wurde, auf einem Rundschüttler bei 250 UpM und 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bis eine OD $_{600}$ von 0.6 erreicht war. Daraufhin wurden 10 μl Phagenlysate (ca. 5×10^4 pfu) zugegeben und mit den Bakterien über Nacht bei 250 UpM und 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.6.3.5.2: Anzucht auf festem Medium

Für die Anzucht von Phagen auf festem Medium wurden je 100 μl geeignet verdünntes Phagenlysate mit je 100 μl vorbehandelten Wirtszellen (siehe 2.6.3.2.3) in sterilen Reaktionsgefäßen gemischt und für 5 min. bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Im Anschluss daran werden je 4 ml auf 43 $^{\circ}\text{C}$ temperierte Top-Agarose (LB-Medium mit 0.7 % Agarose) zugegeben und durch leichtes Schütteln gut mit der Bakterien- / Phagen-Suspension vermischt. Die so entstandene Mischung wurde zügig auf vorbereiteten LB-Agar-

Platten verteilt. Die Platten werden nach einer halbstündigen Trocknungsphase mit Parafilm verschlossen und im Wärmeschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.6.3.6: Vermehrung der gewünschten Phagen

Einer oder mehrere identische, als positiv identifizierte Phagenplaques, wurden mit 500 µl "Plating-Cells" für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Zugabe von 50 µl 0.5 M CaCl₂ Lösung und 5 ml LB-Medium. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C und 220 UpM 4½ Stunden geschüttelt und danach weiterverarbeitet.

Alternativ dazu konnte die Inkubation auch nach der Zugabe von 500 µl 0.5 M CaCl₂ und 50 ml LB bei 37 °C über Nacht erfolgen, um mehr Material zu erhalten.

2.6.3.7: "Plaque-Lifting"

Entsprechend der Größe der Phagenplatte wurden Nylonmembranen zugeschnitten und auf die vorgekühlten Platten (4 °C) gelegt, wobei die Position der Membran auf der Plattenrückseite und auf der Membran markiert wurde, um spätere Zuordnung zu erleichtern.

Nach dreiminütiger Inkubationszeit wurden die Filter mit der DNA-Seite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) getränktes Whatman 3 MM Papier gelegt und zum Denaturieren der DNA für 7 min. dort belassen. Danach wurden die Membranen kurz auf trockenes Whatman Papier gelegt, um überschüssige Denaturierungslösung zu entfernen und im Anschluss auf einem mit Neutralisierungslösung (0.1 M Tris / HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl) getränktem Whatman-Papier für 15 min. neutralisiert. Danach wurden die Filter erneut kurz auf trockenes Whatman-Papier gebracht und dann für 10 min. auf in 2 x SSC (0.3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat (pH 7)) getränktem Whatman-Papier fixiert.

Die auf die Filter transferierte Phagen DNA wurde im Anschluss durch UV-Crosslinking (UV Stratalinker 1800, 120 mJoule, 4 min) auf der Membran fixiert.

2.7: Charakterisierung von *Coleus* Suspensionskulturen

In Zusammenarbeit mit Ute Hegener wurde die *Coleus* 20 Kultur über einen Zeitraum von 13 Tagen, im Bezug auf die RAS-Aktivität und die üblichen Wachstumsparameter, charakterisiert. Die Kultur befand sich zu Beginn der Charakterisierung in ihrer 18. Passage. Die Charakterisierung fand parallel in CB2- und CB4-Medium statt.

Für eine in Marburg neu angelegte Kultur Col M1 wurde in Zusammenarbeit mit Kyung Hee Kim ebenfalls eine Charakterisierung über 10 Kulturtage durchgeführt. Die Kultur befand sich zu diesem Zeitpunkt in der 10. Passage. Die Charakterisierung wurde parallel in CB4, CB5 und CB6 Medium durchgeführt.

Eine weitere ausführliche Charakterisierung in CB2 und CB4-Medium wurde an der ebenfalls in Marburg angelegten Kultur Col M5 über 11 Tage durchgeführt. Im Zuge dieser Charakterisierung wurde auch, über den Verlauf der Kulturperiode, RNA für Expressionsstudien isoliert.

2.7.1: Mediumsparameter

Zur Bestimmung der Mediumsparameter wurden für jeden untersuchten Kulturtag pH-Wert, Leitfähigkeit des Mediums und der Zuckergehalt des Mediums bestimmt.

2.7.2: Wachstumsparameter

2.7.2.1: Bestimmung des Frischgewichtes

Zur Bestimmung des Frischgewichtes wurde der Inhalt eines Kulturkolbens über eine Filternutsche vom Medium getrennt und die Zellen anschließend gewogen.

2.7.2.2: Bestimmung des Trockengewichtes

5 g vom Medium getrennte Zellen wurden in ein vorgewogenes Plastikröhrchen eingewogen und gefriergetrocknet. Danach wurde das Röhrchen mit den trockenen Zellen gewogen und das Gewicht des Röhrchens vom erhaltenen Wert abgezogen.

2.7.3: Inhaltsstoffe

2.7.3.1: Bestimmung des Rosmarinsäure- und Isorinsäure-Gehaltes

Zur Bestimmung der Rosmarinsäuregehalte wurden jeweils mehrere Gramm trocken-gesaugter Zellen eingefroren und gefriergetrocknet. Zur Extraktion wurden davon zweimal 50 mg gefriergetrocknete Zellen mit 3 ml 70 % Ethanol p.a. im Ultraschallbad bei 70 °C für 2 mal 10 min. aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden danach durch 10 minütige Zentrifugation bei 1000g entfernt.

Die so erhaltenen Extrakte wurden 1:10 verdünnt und mittels analytischer HPLC (siehe 2.7.4.2.3) analysiert.

2.7.4: Enzymaktivitäten

2.7.4.1: Bestimmung der PAL-Aktivität:

Die Bestimmung der PAL-Aktivität beruht auf der Messung der Extinktionszunahme bei 290 nm, durch die Bildung des Reaktionsproduktes Zimtsäure. Die Extinktionsänderung wird im Test nach einer Vorinkubationszeit von 10 min. über einen Zeitraum von 30 min. verfolgt, wobei der Wert jede Minute bestimmt wurde.

Pro Ansatz wurden 633 µl Borsäure-Borax-Puffer pH 8 (60.7 Teile einer 0.05 M Na₂B₄O₇- Lösung, 39.3 Teile einer 0.2 M H₃BO₃- Lösung mit 0.05 M NaCl), 167 µl Enzymrohextrakt (siehe 2.7.1.1) und 200 µl 0.1 M Phenylalanin in Borsäure-Borax-Puffer in vorgewärmte Quarzküvetten pipettiert und durch Schütteln gemischt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Phenylalanins gestartet. Die Referenz enthielt kein Phenylalanin und ein entsprechend vergrößertes Puffervolumen.

2.7.4.2: Bestimmung der RAS-Aktivität:

Die Aktivität der Rosmarinsäuresynthase wurde stets mittels eines Enzymtests und anschließender HPLC-Analytik ausgewertet. Folgende Substrate mussten dafür selbst hergestellt werden:

2.7.4.2.1: Substrate für die Rosmarinsäuresynthase

2.7.4.2.1.1: Synthese des Caffeoyl-CoA-Esters

25.2 mg NaHCO₃ wurden in 6 ml bidest. Wasser gelöst und 15 min. mit Stickstoff durchgast. Danach wurden 23 mg Coenzym A als freie Säure zugegeben. Die Mischung wurde erneut 15 min. mit Stickstoff durchgast. Währenddessen wurden 56 mg Caffeoyl-Succinimid-Ester, der freundlicherweise von M. Petersen zur Verfügung gestellt wurde, in 0.5 ml Aceton p.a. gelöst und nach den 15 min. tropfenweise zu der CoA-Lösung gegeben. Im Anschluss daran wurde so viel Aceton zugegeben, wie nötig war, um den gebildeten Niederschlag zu lösen. Das Reagenzglas mit der nun klaren, gelben Flüssigkeit wurde über Nacht, vor Licht geschützt, bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Aceton durch einen über die Lösung geleiteten Stickstoffstrom restlos entfernt und die Lösung 10 min. bei 1000 g zentrifugiert. Das gewünschte Reaktionsprodukt befand sich im Überstand und wurde chromatographisch weiter aufgereinigt.

2.7.4.2.1.2: Reinigung des Caffeoyl-CoA-Esters

Die Reinigung des Esters erfolgte durch eine Chromatographie an Polyamid SC 6 (Polycaprolactam, Korngröße 0.05 – 0.16 mm) nach Strack et al. (1987).

Das Säulenmaterial wurde mit 10 % Ammoniaklösung versetzt und 10 min. lang gerührt. Das Material wurde anschließend so lange mit bidest. Wasser gewaschen, bis ein neutraler pH-Wert erreicht war. Danach wurde das Säulenmaterial für 10 min. in 10 % iger Salzsäure gerührt und im Anschluss erneut bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 5-6 mit bidest. Wasser gewaschen. Das Material wurde nun mehrmals mit Methanol gewaschen und in eine Glassäule (2 x 27 cm) gefüllt, die anschließend mit 5 l bidest. Wasser

äquilibriert wurde. Nach Auftragen der wässrigen Caffeoyl-CoA-Ester Lösung wurde die Säule stufenweise eluiert:

1. 250 ml bidest. H₂O
2. 250 ml Methanol
3. 25 µl 25 % Ammoniak in 250 ml Methanol
4. 105 µl 25 % Ammoniak in 350 ml Methanol
5. 175 µl 25 % Ammoniak in 350 ml Methanol
6. 350 µl 25 % Ammoniak in 350 ml Methanol
7. 1050 µl 25 % Ammoniak in 350 ml Methanol
8. 1500 µl 25 % Ammoniak in 300 ml Methanol

Von den einzelnen Fraktionen wurden photometrisch Spektren aufgenommen, an Hand derer die Anwesenheit des CoA-Esters in den Elutionsstufen bestimmt werden konnte. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 180 – 200 mbar und 40 °C zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden in einem geringen Volumen bidest. Wasser rückgelöst. Durch ein erneutes Spektrum wurde die Konzentration an Ester mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für Caffeoyl-CoA (ϵ_{346} : $18 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) in der Lösung ermittelt und auf eine Konzentration von 2.5 mM verdünnt.

2.7.4.2.2: Enzymtest zur Bestimmung der RAS-Aktivität

Die Rosmarinsäuresynthesetests wurden nach der von Petersen und Alfermann (1998) beschriebenen Methode durchgeführt. Folgende Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße pipettiert:

- | | |
|-------|---------------------------------------|
| 10 µl | 0.1 M DTT |
| 5 µl | 12.5 M Ascorbat |
| 45 µl | 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 |
| 50 µl | Enzymextrakt (siehe 2.7.1.1) |
| 10 µl | 2.5 mM Caffeoyl-CoA |
| 5 µl | 10 mM DL-p-Hydroxyphenyllactat (pHPL) |

Kontrolltests ohne Substrate und mit entsprechend vergrößertem Puffervolumen (Gesamtvolumen von 125 µl) wurden ebenfalls durchgeführt. Alle Tests wurden gründlich gemischt und für 15 min. bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Ansäuern mit 10 µl 6 N HCl gestoppt.

Zur Analyse wurden die Tests zweimal mit 0.5 ml Ethylacetat p.a. ausgeschüttelt. Zur besseren Phasentrennung wurde im Anschluss daran kurz zentrifugiert. Die Ethylacetatphasen wurden jeweils in 1.5 ml Eppendorf-Gefäßen vereinigt und im Exsikkator bis zur Trockne eingedampft.

Die trockenen Rückstände wurden in 100 µl 50 % Methanol mit 0.01 % o-Phosphorsäure (85 %) gelöst und über HPLC analysiert.

2.7.4.2.3: HPLC-Analytik

Die Extrakte der Enzymtests wurden mittels analytischer High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysiert.

Dazu wurden folgende Parameter angewandt:

Vorsäule: Shandon Hypersil ODS 4 x 20 mm
Trennsäule: Shandon Hypersil ODS 4 x 250 mm
Mobile Phase: 50 % Methanol mit 0.01 % Phosphorsäure, isokratisch
Flussrate: 0.85 – 1 ml / min
Detektion: 333 nm
Injektionsvolumen: 20 µl

Das Säulenmaterial der „reversed phase HPLC“ besteht aus porösen Kieselgelpartikeln, die in der Regel mit n-Alkyl-Ketten versehen sind. In unserem Fall liegen C₁₈-Ketten vor. Der Name „reversed phase“ leitet sich daraus her, dass diese Säule eine hydrophobe stationäre Phase besitzt. Hydrophile Substanzen eluieren somit schneller als hydrophobe, die stärkere Wechselwirkungen mit der Matrix besitzen. Zur Verdünnung der Proben und als mobile Phase wurde in unserem Fall angesäuertes 50 %iges Methanol verwendet, da so alle Substanzen in vollständig protonierter Form vorliegen und jeweils in einem Peak eluiert werden. Das Laufmittel wurde vor der Verwendung partikelfrei filtriert.

Die Quantifizierung des Produktes erfolgte mittels eines externen Standards, entweder für Rosmarinsäure (0.5 nmol RA / 20 µl) oder für Isorinsäure (0.5 nmol Isorinsäure /20 µl).

2.8: Methoden zur Reinigung der Rosmarinsäuresynthase

Die Reinigung der RAS erfolgte zunächst unverändert nach den Methoden von Juliane Meinhard (1995). Die Affinitätschromatographie an „R-2382 Reactive Yellow 86 Agarose“ wurde später als zusätzlicher Reinigungsschritt eingeschoben.

2.8.1: Reinigungsschritte

2.8.1.1: Herstellung eines Enzym-Rohextraktes

Zur Enzymisolierung wurden *Coleus blumei* Zellen aus CB4-Medium vom 7. Kulturtag verwendet, da hier die höchste spezifische RAS-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Zur weiteren Verarbeitung wurde das Medium auf einer Filternutsche mit Filterpapier durch eine Wasserstrahlpumpe vollständig abgesaugt. 50 g der so gewonnenen Zellen wurden sodann im vorgekühlten Mörser mit 10 g Polyclar 10 und 50 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 mit 1 mM DTT versetzt. Die Zellen wurden so lange auf Eis gemörsert, bis sich eine homogene, flüssige Masse ergab, die dann in Zentrifugenbecher gegossen wurde. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge (48000 g) wurde der Überstand durch Glaswolle filtriert.

Aliquots dieses Rohextraktes wurden nach jeder Extraktion eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt zur Bestimmung der Rosmarinsäuresynthase-Aktivität sowie der Proteinkonzentration verwendet. Der Rest des Überstandes wurde für die Ammoniumsulfatfällung weiterverwendet.

2.8.1.2: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung ist der erste Schritt in der Reinigung der Rosmarinsäuresynthase. Diese recht einfache und wirkungsvolle Methode zur groben Fraktionierung und Konzentrierung von Proteinlösungen (Cooper 1981) erwies sich auch für die Reinigung der Rosmarinsäuresynthase als sinnvoll. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Wir verwendeten vorgekühlte, gesättigte Ammoniumsulfatlösung pH 7.0. Im ersten Schritt wurden zu 1 Volumenteil Proteinlösung innerhalb von 20 min. 1.5 Volumenteile der gesättigten Ammoniumsulfatlösung tropfenweise zugegeben, so dass eine 60 % ige Sättigung erreicht wurde. Die Lösung wurde weitere 20 min. gerührt und danach durch 20-minütige Zentrifugation bei 41416 g in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert, um präzipitierte Komponenten zu sedimentieren. Der Überstand wurde für einen weiteren Fällungsschritt verwendet. Hier wurden nun im Zeitraum von 20 min. zu 1 Volumenteil des Überstandes genau 1 Volumenteil der gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugegeben, um eine 80 %ige Sättigung zu erreichen. Auch hier wurde noch weitere 20 min. gerührt. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 41416 g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 10 mM KPi-Puffer mit 1 M Ammoniumsulfat, pH 7.0 mit 1 mM DTT gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8.1.3: Säulenchromatographische Methoden

Vor jedem Auftrag auf die Säule wurde der Enzymextrakt 10 min. bei 4 °C mit 15115 g zentrifugiert, um Schwebeteilchen oder eventuelle Verunreinigungen zu entfernen.

Die chromatographischen Reinigungsschritte wurden mit Hilfe eines HPLC-Systems bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden partikelfrei filtriert. Die Detektion des Proteins erfolgte in allen Läufen bei 280 nm. Die Fraktionen wurden grundsätzlich auf Eis gesammelt. Die Bestimmung der Salzkonzentration in den Fraktionen erfolgte mit Hilfe eines Handrefraktometers. Alle gesammelten Fraktionen wurden auf RAS-Aktivität getestet.

2.8.1.3.1: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Fractogel TSK Butyl

In wässriger Lösung assoziieren an der Oberfläche liegende hydrophobe Bereiche in Proteinstrukturen bevorzugt mit hydrophoben Oberflächen. Durch Erhöhung der Ionenstärke in einer Proteinlösung mit Hilfe eines geeigneten Salzes, z.B. Ammoniumsulfat, können die hydrophilen Gruppen eines Proteins abgeschirmt werden und somit die hydrophobe Wechselwirkung verstärkt werden. Die hydrophoben Regionen des Proteins können dann mit den hydrophoben Gruppen des Säulenmaterials eine Wechselwirkung eingehen. Wird die Salzkonzentration in der mobilen Phase verringert, verlieren die hydrophilen Gruppen im Protein ihre Abschirmung. Daher kann die Bindung des Proteins durch abnehmende Ionenstärke im Chromatographiepuffer wieder gelöst werden.

Material: 10 ml Fractogel TSK Butyl-650 (M)
 Puffer: A: 10 mM KPi, 1 M Ammoniumsulfat, pH 7.0, 1 mM DTT
 B: 10 mM KPi, pH 7.0, 1 mM DTT
 Programm: 0-10 min. isokratisch A
 10-55 min. linearer Gradient A-B
 55-65 min. isokratisch B
 Flussrate: 1 ml /min
 Fraktionsgröße: 2 ml

Die Fraktionen, die Rosmarinsäuresynthase-Aktivität zeigten, wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mit Zentrifugalkonzentratoren bei 4 °C konzentriert. Das Konzentrat wurde bis zur Benutzung bei -20 °C aufbewahrt.

2.8.1.3.2: Affinitätschromatographie

Hierbei liegt normalerweise ein Ligand vor, der über einen Abstandhalter (Spacer) mit der Säulenmatrix verbunden ist. Dieser Ligand kann im Idealfall ein spezifischer Ligand für das gesuchte Protein sein. Es kann sich aber auch um einen Liganden handeln, mit dem Proteine interagieren, zum Beispiel einen Farbstoff. Im Idealfall ermöglicht somit diese Methode die Trennung von Makromolekülen aufgrund ihrer individuellen biologischen Funktion. Die Proteine werden an den biospezifischen Liganden oder die reaktiven Gruppen der Matrix adsorbiert und können von diesen beispielsweise durch Erhöhung der Ionenstärke im Puffer oder aber mit ihrem spezifischen Substrat, gegebenenfalls auch mit einem Cofaktor wieder eluiert werden.

2.8.1.3.2.1: R-2328 Reactive Yellow 86 Agarose

Reactive Yellow 86 Agarose, ein gelber an Agarose gebundener Farbstoff, soll in der Lage sein, CoA-abhängige Proteine zu binden und sie somit von anderen zu trennen (Hohlfeld et al. 1995, 1996, Yu und Facchini 1999). Unter dieser Annahme wurde der Trennungsschritt in die Reinigung eingebaut. Zunächst wurde versucht, das Protein mit Caffeoyle-CoA in einer Konzentration von 0.5 mM nach anfänglichem Waschen mit 10 mM KPi zu eluieren. Dies war aber unnötig, da das Protein bereits beim Waschen die Säule verließ. Da auf diese Weise aber ein gutes Reinigungsergebnis erzielt wurde, wurde der Schritt leicht verändert im Reinigungsschema belassen.

Material:	6 ml Reactive Yellow 86 Agarose mit 2-3 mg Farbstoff / ml Gel
Puffer:	10 mM KPi, pH 7.0, 1 mM DTT
Programm:	isokratisch
Flussrate:	0.5 ml / min
Fraktionsgröße:	1.5 ml

2.8.1.3.2.2: Fractogel TSK AF-Blue

Fractogel TSK AF-Blue besitzt als funktionelle Gruppe einen blauen Triazinfarbstoff, der für die Trennung von Nukleotid-abhängigen Enzymen geeignet ist. Die Annahme, dass dieses Material gleich oder ähnlich der funktionellen Gruppe des Triazinfarbstoffes Cibacron Blue F3 G-A ist, der auch CoA-abhängige Enzyme bindet, war verantwortlich für den Versuch, dieses Material zu testen.

Da mit diesem Material auch bereits bei Juliane Meinhard (1995) gute Ergebnisse erzielt wurden, wurde dieser Schritt in den Reinigungsablauf übernommen.

Material:	8 ml Fractogel TSK AF-Blue
Puffer:	A: 10 mM KPi, pH 7.0, 1 mM DTT B: 10 mM KPi, 1 M KCl, pH 7.0, 1 mM DTT
Programm:	0-10 min isokratisch A 10-40 min linearer Gradient A-B 40-50 min isokratisch B
Flussrate:	1 ml / min
Fraktionsgröße:	2 ml

2.8.1.4: Native Gelelektrophorese

Native Gelsysteme enthalten kein SDS. Aus diesem Grund richtet sich die Ladung der Proteine im Gel nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem pH des verwendeten Puffers. Im nativen System wird das Protein direkt und ohne Vorbehandlung auf das Gel aufgetragen und wandert je nach Ladung zur Kathode oder zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins hängt hier von seiner Ladung, seiner Größe, der Porosität der Gelmatrix und dem pH von Trenngel und Laufpuffer ab.

Hier wurde die Methode von Ornstein (1964) verwendet. Die Elektrophorese wurde wie für die SDS-PAGE durchgeführt, nur dass hierbei kein SDS oder Mercaptoethanol in Puffer oder Gel verwendet wurde.

2.8.1.4.1: Probenbehandlung

4 Volumenteile Probe und 1 Volumenteil Probenpuffer wurden gemischt. Die Proben wurden für ca. 5 bis 10 min. auf Eis inkubiert und danach auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke (30 mA) und bei 4 °C durchgeführt.

Probenpuffer: 3.3 ml 1.9 M Tris / HCl pH 6.8
 6.6 ml Glycerin
 0.1 ml 1 % Bromphenolblau

2.8.1.4.2: Acrylamid-Gele

Die Gelzusammensetzung war hier die gleiche wie bei der denaturierenden Elektrophorese, nur dass SDS in Trenn- und Sammelgel durch Wasser ersetzt wurde. Auch wurde das Gel nicht mit SDS überschichtet, um eine bessere Polymerisation zu erreichen, sondern mit n-Butanol.

2.8.1.4.3: Elektrodenpuffer und Elektrophorese

Die Behandlung der Gele entsprach der Behandlung der denaturierenden Gele mit der Ausnahme, dass der Lauf bei 4 °C stattfand. Die Pufferzusammensetzung entsprach ebenfalls der für SDS-Gele allerdings ohne SDS:

Kathodenpuffer: 0.025 M Tris, 0.192 M Glycin
Anodenpuffer: 0.025 M Tris / HCl pH 8.3

2.8.1.4.4: Detektion der RAS-Aktivität im Gel

Nach der nativen Gelelektrophorese wurden die Gelbahnen des Trenngels vertikal (in Laufrichtung) mit einem Skalpell in Streifen geschnitten und horizontal (quer zur Laufrichtung) in je 1 cm breite Stücke geteilt. Die so erhaltenen Segmente wurden jeweils in 1.5 ml-Eppendorfgefäße gegeben und mit 400 µl Elutionspuffer (0.1 M KPi pH 7.0 mit 10 mM DTT und 0.5 mM Ascorbat) versetzt und für 5 h bei 4 °C eluiert. Danach wurden jeweils 220 µl Eluat entnommen, mit 20 µl 2.5 mM Caf-CoA und 10 µl 20 mM pHPL versetzt und 30 min. bei 30 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach Abstoppen der Reaktion mit 20 µl 6 N HCl wurden die Proben extrahiert und analysiert.

Um eine saubere Trennung des Produktes von zusätzlich aus dem Gel eluierten Stoffen zu erhalten, wurde für die HPLC-Analyse 42.5 % Methanol mit 0.01 % o-Phosphorsäure als mobile Phase verwendet.

2.9: Methoden zur Klonierung der Phenylalanin Ammonium-Lyase

Für die Klonierung der Phenylalanin Ammonium-Lyase wurde von einem heterologen PAL-Klon aus *Solanum tuberosum*, pAL 23 (Joos und Hahlbrock 1992), ausgegangen, der freundlicherweise vom MPI in Köln zur Verfügung gestellt wurde. Mit einem Fragment dieses Klons, siehe Tabelle 2, wurde eine Lambda gt-10 cDNA-Bank von *Coleus blumei* (Petersen et al. 1995) durchsucht, um einen homologen Klon für die PAL zu erhalten.

Sonde	Sequenz / Literaturangabe zum Klon	Hybridisierungstemperatur
pAL 23	Joos und Hahlbrock 1992 (<i>Solanum tuberosum</i>)	60 °C
PAL-1	ATCCTGCAAAACTAACATATTGGAAGAGGTTCGCCATTCCAAGCCTCGA GGCATTTCACAACATGGATCAACTATGAGCCCATTGCTCAACGCCGTGAA CACCTTCTCACCTCTTCCCCGGGCGACACCGTCTTCTCCCCCGTCAAG AATCCAGTCCCCAGCTCCTCCCTGATGAAGCTGTACAGCGGATAAGACC TGCATTCCCTTGATCCTGTTGGGAACGGCGGGGTTTCCAGCCTCCAGTGC GACTCTGGCGGCCTCGATTTCTTAGGAAGGACGGCCTTGAGCTCTTCC TCGAACACTTGGATCTTCTGGAAGATGGAAGTGGTCGCATTCTTTTCAT TGTCCCCGTTCTTGAAGGCGTGGTCNACCANCACCTGCCTCCAGCTTCC TGCATCAANCGGTTAGCTGCCGCTTGCCANGCGTTC	68 °C

Tab. 2: Sequenzen und Hybridisierungstemperaturen der für die Klonierung der PAL verwendeten Sonden.

Siehe 2.5.1.9 - Zur Markierung der Sonden, 2.5.1.10 - Filterhybridisierung und 2.5.3.7 - Transferieren der Phagen-DNA auf Nylonmembranen **N**=A,C,G,T; **B**=C,G,T; **D**=A,G,T; **H**=A,C,T; **V**=A,C,G; **K** = G,T; **M** = A,C; **R** = A,G **S**=C,G; **W**=A,T; **Y**=C,T; **I**= Inosin

Einer der durch diese Suche aufgefundenen Klone, PAL-1, wurde für eine weitere Suche auch in der neu angelegten fraktionierten cDNA-Bank (2.9.1) verwendet. Die Sequenz des als Sonde benutzten Fragmentes dieses Klones ist ebenfalls in Tabelle 2 gezeigt.

2.10: Methoden zur Klonierung der Rosmarinsäuresynthase

Für die Klonierung der RAS aus *Coleus blumei* wurden verschiedene Ansätze benutzt. Zum einen wurde versucht, mit Hilfe der aus den Proteinsequenzierungen erhaltenen Peptidsequenzen Sonden herzustellen, mit denen eine cDNA-Bank durchsucht werden konnte. Als anderer Ansatz wurde versucht, die so erhaltenen Sequenzen für PCR sowie RT-PCR einzusetzen.

2.10.1: Erstellen einer fraktionierten cDNA-Bank

Komplementäre DNA-Banken (cDNA von complementary DNA) beinhalten die Information der Messenger RNA (mRNA) eines Gewebetyps oder Organismus zum Zeitpunkt der Isolierung. Da RNA selbst recht schwierig zu handhaben und in natürlicher Form schlecht zu replizieren ist, wird im Verlauf der cDNA-Synthese mRNA in stabile komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Insetiert man diese cDNA in einen selbstreplizierenden Lambda Vektor, wird es zusätzlich möglich, die Information zu vervielfältigen und einen relativ leichten Zugriff zu erhalten. In diesem Fall wurde die cDNA-Bank mit Hilfe des „ZAP Express™ cDNA Synthesis Kit“ sowie dem "ZAP Express™ cDNA Gigapack® III Gold Cloning Kit" (Stratagene) aus Suspensionskulturen der Zelllinie Col. 16 vom sechsten Tag der Kulturperiode erstellt. Die Herstellerangaben wurden weitgehend eingehalten.

Abweichungen ergaben sich lediglich durch den Verzicht auf den Einbau radioaktiven dNTPs bei der Zweitstrangsynthese und die Verwendung von Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung der cDNA, anstelle der von Stratagene vorgeschlagenen Gelfiltration. Zu diesem Zweck wurde die cDNA auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen (siehe 2.6.1.5.1) und eine Größenfraktionierung durch Zerschneiden des Gels mit anschließender Elution der enthaltenen DNA (siehe 2.6.1.6.1) vorgenommen.

2.10.2: Durchsuchen von cDNA-Banken

Folgende Sonden wurden zum Suchen in cDNA-Banken von *Coleus blumei* eingesetzt:

Sonde	Sequenz	Hybridisierungstemperatur
MP-6	CAYATGGARMGNTTYGARAAR	37 °C
MP-10	AARYTIACIMGIGAYCARYTIAAY	37 °C
RAS-AB-1	GTIGARTTYTAYCCCIWSITTYGG	40 °C
RAS-2	CCWGCWCCWACWCC	40 °C

Tab. 3: Sequenzen und Hybridisierungstemperaturen der für die Klonierung der PAL verwendeten Sonden

N=A,C,G,T; B=C,G,T; D=A,G,T; H=A,C,T; V=A,C,G; K = G,T; M = A,C; R= A,G S=C,G;

W=A,T; Y=C,T; I= Inosin

Siehe 2.5.1.9 - Zur Markierung der Sonden, 2.5.1.10 - Filterhybridisierung und 2.5.3.7 - Transferieren der Phagen-DNA auf Nylonmembranen

2.10.3: PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) macht sich die Tatsache zunutze, dass das an heißen Quellen lebende Bakterium *Thermophilus aquaticus* eine DNA-Polymerase besitzt, die auch Temperaturen über 90 °C kurzfristig ohne Aktivitätsverlust übersteht. Dieses Enzym, kurz Taq-Polymerase, besitzt ein Temperaturoptimum bei 72 °C. Verschiedene Hersteller bieten inzwischen auch Polymerasen an, die nicht aus *Thermophilus* stammen und auf unterschiedliche Weise verändert sind. In den hier durchgeführten Experimenten wurde zum einen eine durch genetisch modifizierte Bakterien hergestellte Taq-Polymerase der Firma Promega verwendet, die ansonsten die gleichen Eigenschaften besitzt wie das Originalenzym, sowie eine modifizierte Polymerase der Firma Qiagen (HotStar™-Taq). Diese Polymerase ist derart verändert, dass eine einmalige Vorinkubation von 15 min. bei 95 °C notwendig ist, um das Enzym zu aktivieren. Dieser so eingebaute "Heiß Start" verhindert unspezifisches Ablesen von DNA durch die Polymerase während der Aufheizphase des PCR-Gerätes. Auch garantiert diese Vorinkubation eine vollständige Denaturierung der eingesetzten DNA, ohne die Aktivität des Enzyms zu senken.

Jeder PCR-Zyklus beginnt, unabhängig von der für die HotStar™-Taq erforderlichen Vorinkubation, mit einer Denaturierungsphase zwischen 92 und 97 °C. Während bei 92 °C die Halbwertszeit des Enzyms sehr hoch ist (>120 min), werden lange, komplexe DNA-Sequenzen bei dieser Temperatur unter Umständen noch nicht vollständig denaturiert. Nach der Denaturierungsphase wird die Temperatur so weit abgesenkt, dass sich die Primer an die zu amplifizierende DNA anlagern können (annealing). Die hierfür benötigte Temperatur ist abhängig vom GC-Gehalt, dem Degenerationsgrad und von der Sequenzhomologie der Primer mit der Ziel-DNA. Generell ist bei Temperaturen unter 50 °C die Primeranlagerung hoch, Fehlpaarungen sind aber häufig. Die Chance für Fehlpaarungen sinkt mit steigender Temperatur, was von PCR-Techniken, wie zum Beispiel der "Touch down PCR", bei der in den ersten Zyklen mit einer annealing Temperatur von 70 oder 72 °C gearbeitet wird, ausgenutzt wird, um hochspezifische Amplifikate zu erhalten. Die annealing Temperatur wird dann für die nachfolgenden Zyklen abgesenkt, um eine ausreichende Menge an amplifizierter DNA zu erhalten, da die Effizienz der Primeranlagerung mit steigender Temperatur ebenfalls abnimmt. Die eigentliche Reaktion, die Extension, findet normalerweise bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Polymerase statt. Die Dauer der Extension richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden Stückes. Bei einer Inkorporationsrate von ca. 35-100 Nukleotiden pro Sekunde, wird etwa eine Minute für ein kb benötigt. Die PCR besteht nun aus einer Wiederholung dieser drei Schritte. Die Menge der amplifizierten DNA hängt hierbei zum einen von der Menge der als Matrize eingesetzten DNA, zum anderen von der Anzahl der durchgeführten Zyklen ab. Da die Zahl der Amplifikate mit der Zahl der Zyklen exponentiell steigt, ist mit der Erhöhung der Zyklenzahl der größere Effekt zu erzielen. Es muss allerdings beachtet werden, dass mit steigender Zyklenzahl auch mögliche Fehlpaarungen stärker ins Gewicht fallen. Eine sinnvolle Kombination aus Zyklenzahl und eingesetzter DNA, sowie die Abstimmung der Temperaturen innerhalb der Schritte, muss individuell auf die Anforderungen der jeweiligen PCR angepasst werden.

2.10.3.1: PCR-Primer und Bedingungen

Als Primer für die PCR wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Da nach der Proteinsequenzierung nicht bekannt war, in welcher Richtung

die Sequenzen orientiert waren und an welcher Stelle des Gens sie sich befanden, wurden für die PCR Sinn- und Gegensinn-Primer eingesetzt.

Sonde		Sequenz
RAS 1	F.	GTBGARTTYTAYCC
	R.	GGRTARAAATCVAC
RAS 2	F.	CCWCGWCCWACWCC
	R.	GGWGTWGGWCGWGG
RASAB 1	F.	GTIGARTTYTAYCCIWSITTYGG
	R.	CCRAAISWIGGRTARAAATCIAC
RASAB 2	F.	GARITICARGARGA
	R.	TCYTCYTGIAIYTC
RAS-AB 4	F	ARCCWGCHCCWACHCC
λ gt 10	F.	GCCTCGAGCAAGTTCAGCCTGGTAAG
	R.	GCCTCGAGTATTTCTTCCAGGG

Tab. 4: Für die PCR verwendete Primer. F steht für die normale Leserichtung (forward), R für den entsprechenden Primer in Gegensinnrichtung (reverse). Die Sequenz steht hier immer in 5'-3' Richtung.

N=A,C,G,T; B=C,G,T; D=A,G,T; H=A,C,T; V=A,C,G; K = G,T; M = A,C; R= A,G S=C,G; W=A,T; Y=C,T; I= Inosin

Als Matrizen-DNA für die PCR-Reaktion wurde entweder genomische DNA aus *Coleus blumei* Suspensionskulturen, Sprosskulturen oder Blättern, genomische DNA aus *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula vera*, *Blechnum brasiliense*, *Lamium album* und *Melissa officinalis* oder isolierte Phagen-DNA aus der Lambda gt-10 cDNA-Bank verwendet. Bei letzterer wurde versucht, mit Hilfe eines phagenspezifischen und eines genspezifischen Primers entsprechende Transkripte aus der cDNA-Bank zu erhalten. Wurde genomische DNA als Matrize eingesetzt, wurden zwei genspezifische Primer verwendet.

Die für die PCR verwendeten Primerkombinationen und Programme sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Primer-kombination	Denaturierung		Annealing		Extension		Zyklus-zahl		
	95 °C	15 /5 min.	40 °C bis	2 min.	72 °C	3 min.	32	1	
RAS 1-F/R	95 °C	15 /5 min.	40 °C bis	2 min.	72 °C	3 min.	32	1	
		1 min.		50 °C		2 min.		3 min.	30
		1 min.		3 min.		10 min.		1	
RASAB 1-F/R	95 °C	15 /5 min.	40 °C bis	2 min.	72 °C	3 min.	32	1	
		1 min.		56 °C		2 min.		3 min.	30
		1 min.		3 min.		10 min.		1	
RASAB 1-F/R λ gt 10 F/R oder R/F	95 °C	15 /5 min.	40 °C bis	2 min.	72 °C	3 min.	32	1	
		1 min.		56 °C		2 min.		3 min.	30
		1 min.		3 min.		10 min.		1	

Tab. 5: Primerkombinationen und zugehörige PCR Programme. F/R bedeutet hier, dass der jeweilige Sinn- oder Gegensinn-Primer verwendet wurde. Je nach verwendeter Polymerase betrug die Dauer des ersten Denaturierungsschrittes 15 (HotStar™-Taq) oder 5 (Taq-Promega) Minuten. Die Annealing-Temperatur wurde in verschiedenen Experimenten im angegebenen Temperaturbereich variiert.

Ergänzend zu den in Tabelle 5 aufgeführten PCR-Parametern wurde, um ausschließen zu können, dass die teilweise stark degenerierten Primer vor Erreichen der Elongationstemperatur von der Matrizen-DNA abfallen, für jede Primerkombination ein langsamerer Temperaturanstieg (0.5-1 °C / Sek.) von der Annealing-Temperatur auf die Extensionstemperatur einprogrammiert.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden wie folgt variiert:

Komponente	Endkonzentration im PCR-Ansatz (50 µl)	PCR mit HotStar™-Taq	PCR mit Taq-Polymerase von Promega
10x PCR Puffer	1x konzentriert	Γ	Γ
dNTP .- Mix	200 µM jedes dNTPs	Γ	Γ
MgCl ₂	1.5 - 3.5 mM	max. 2mM	Γ
Primer A	0.1 - 1 µM	Γ	Γ
Primer B	0.1 - 1 µM	Γ	Γ
Matrizen-DNA	Bis zu 1µg	Γ	Γ
Steriles Wasser	Variabel	Γ	Γ
Polymerase	1 / 2.5 units	2.5 units	1 unit
5x Q-Solution	1x konzentriert	variiert	nicht verwendet

Tab. 6: PCR-Bedingungen. Als PCR-Puffer wurde der jeweils vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet. Die Mg²⁺ Konzentration wurde erhöht, wenn eine bessere Primerbindung gewünscht war und erniedrigt, sofern eine höhere Spezifität erreicht werden sollte. Eine hohe Primerkonzentration wurde bei stark degenerierten Primern eingesetzt. Eine hohe Konzentration an Matrizen-DNA wurde vor allem bei genomischer DNA eingesetzt, um die Chance zu erhöhen, ein Transkript zu erhalten. Die Verwendung von Q-Solution diente der Erhöhung der Spezifität der Reaktion. PCR-Ansätze, die nicht mit HotStar™-Taq angesetzt wurden, wurden grundsätzlich auf Eis pipettiert und erst nach Erreichen der Anfangstemperatur des PCR-Zyklus in das Gerät eingesetzt.

2.10.3.2: RT-PCR:

Unter RT-PCR versteht man eine PCR Reaktion, der ein Umschreiben von mRNA in cDNA durch reverse Transkriptase (RT) Reaktion vorausgeht, also PCR an cDNA. Allerdings genügt für die RT-PCR eine Einzelstrangsynthese, weshalb es nicht nötig ist, eine komplette cDNA-Synthese durchzuführen.

Der Vorteil der RT-PCR im Gegensatz zu PCR mit genomischer DNA liegt darin, dass die Gesamtanzahl der in der PCR vorhandenen Gene herabgesetzt wird und nur noch die transkribierten Gene zur Verfügung stehen. Die PCR wird so spezifischer und die Chance, ein als Einzelkopie vorliegendes Gen zu erhalten, größer.

Gegenüber dem Suchen in cDNA-Banken liegt der Vorteil hauptsächlich darin, dass der durch die Amplifikation in Phagen auftretende "Verdünnungsfaktor" wegfällt und so die Chance, seltene Gene zu erhalten, steigt.

Der größte Nachteil der RT-PCR liegt in der RT-Reaktion. Hier werden in der Regel nur 10 - 30 % der mRNA in cDNA umgeschrieben.

Die RT-PCR wurde in dieser Arbeit mit dem „Omniscript™ RT Kit“ (Qiagen) weitgehend nach Herstellerangaben durchgeführt, lediglich auf die Zugabe von RNase

Inhibitor wurde verzichtet. Als Primer für die Erststrangsynthese wurden in unterschiedlichen Ansätzen Zufallshexamere, oligo-dT(15)-Primer oder eine Mischung aus beidem verwendet. Die Endkonzentration der Primer lag immer bei 1 μ M. Anschließend wurde mit der so gewonnenen cDNA eine PCR durchgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden, wie in Tabelle 6 beschrieben, gewählt. Für die RT-PCR wurde nur die HotStar™-Taq Polymerase verwendet. Die Zyklenparameter und Primerkombinationen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Primerkombination	Denaturierung		Annealing		Extension		Zykluszahl	
	RAS 1-F/R	95 °C	15 min.	45 °C bis 50 °C	2 min.	72 °C	3 min.	32
RAS 2-R/F	1 min.		2 min.		3 min.		30	
	1 min.		3 min.		10 min.		1	
RASAB 1-F/R	95 °C	15 min.	45 °C bis 56 °C	2 min.	72 °C	3 min.	32	1
RASAB 2-R/F		1 min.		2 min.		3 min.		30
		1 min.		3 min.		10 min.		1
RASAB 1-F/R	95 °C	15 min.	45 °C bis 65 °C	2 min.	72 °C	3 min.	32	1
RASAB 2-R/F		1 min.		2 min.		3 min.		30
RAS 1-F/R				1 min.		3 min.		10 min.
RAS 2-R/F								
RAS-AB 4								
Oligo-dT(15)								

Tab. 7: Primerkombinationen und Zyklenparameter für die RT-PCR. F/R bedeutet hier, dass der jeweilige Sinn- oder Gegensinn-Primer verwendet wurde. Die Annealing-Temperatur wurde in verschiedenen Experimenten im angegebenen Temperaturbereich variiert. Wurde oligo-dT(15) als zweiter Primer eingesetzt, wurde pro Reaktion je einer der in dieser Spalte angegebenen genspezifischen Primer eingesetzt.

2.10.3.3: 3'- und 5'-RACE-PCR und SMART™ cDNA Synthese

Um einen Vollängenklon des möglichen RAS-Klones RAS-1.1 zu erhalten, wurde eine in 5'- und 3'-gerichtete RACE-PCR durchgeführt. Die RACE-(rapid amplification of cDNA ends) Reaktion benutzt die Möglichkeit, bei der vorangehenden cDNA Synthese bestimmte Oligonukleotide an die Enden der cDNA anzuhängen. In dem in dieser Arbeit verwendeten Kit wird zum einen ein modifizierter oligo-dT Primer verwendet, der mit einem Ankernukleotid die Bindung am Beginn der PolyA-Region erreichen soll und zum anderen wird die Eigenschaft der reversen Transkriptase ausgenutzt, am 5'-Ende der von ihr generierten cDNA mehrere Basen Cytosin zu addieren. An diese dC reichen Enden bindet noch während der RT-Reaktion ein spezielles Oligonukleotid, das somit eine verlängerte Matrize für die RT darstellt. Nach der cDNA-Synthese existiert somit cDNA, die entweder am 3'- oder am 5'-Ende spezifisch markierte Enden aufweist. Ausgehend von einem genspezifischen Primer kann nun über diese spezifisch markierten Enden das Gen entweder in 5'- oder in 3'-Richtung amplifiziert werden.

Die cDNA-Synthese wurde ausgehend von PolyA⁺-RNA exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Die für die RACE-PCR verwendeten genspezifischen Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Name	Sequenz
RAS-1.1-GSP-1-F	5´GGCAGAAACCCCACCATGCCTGCGCCTGA 3´
RAS-1.1-GSP-1-R	5´TCAGGCGCAGGCATGGTGGGGTTTCTGCC 3´
RAS-1.1-GSP-2-F	5´CCAACCCCAAACCTCTAGCGTCCCCACACAC 3´
RAS-1.1-GSP-2-R	5´GTGTGTGGGGACGCTAGAGTTTGGGGTTGG 3´

Tab. 8: Genspezifische Primer für die RACE-PCR. Sinn- und Gegensinn-Primer wurden in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt, da nicht klar war, in welcher Richtung der Klon RAS-1.1 orientiert war.

Mit diesen Primern und den zum Kit gehörenden universellen Primern wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt. Diese Variante der PCR-Reaktion beginnt mit Annealing-Temperaturen, die dem genspezifischen Primer eine Bindung ermöglichen, dem zweiten, wie auch in diesem Fall meist unspezifischen Primer, aber nicht. So wird in den ersten Zyklen der PCR ausschließlich ausgehend von dem genspezifischen Primer amplifiziert, was die Spezifität der PCR-Reaktion erhöht. Danach wird die Annealing-Temperatur langsam abgesenkt, so dass es auch für den unspezifischen Primer möglich ist, an die Matrizen-DNA zu binden.

Die Zyklenbedingungen für die in Tabelle 8 aufgelisteten genspezifischen Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Denaturierung		Annealing		Extension		Zyklenzahl	
95 °C	1 min.	72 °C			3 min.	31	5
	1 min.	70 °C	1 min.	72 °C	3 min.		5
	1 min.	68 °C	1 min.	72 °C	3 min.		25
	1 min.	68 °C	1 min.	72 °C	5 min.		1

Tab. 9: Zyklenparameter für die RACE-PCR. Für die PCR-Reaktion wurde immer je einer der in Tabelle 7 aufgeführten genspezifischen Primer und der im Kit mitgelieferte universelle Primer verwendet

Für die PCR wurden 5 µl aus der vorangegangenen cDNA-Synthesereaktion eingesetzt. Ein Ansatz von 50 µl enthielt außerdem in der 5´-RACE Reaktion 5 µl des universal primer mix (UPm) [10 µM], 1 µl des entsprechenden genspezifischen Primers (GSP) [10 µM], 5 µl des mitgelieferten Puffers [10x], 1 µl einer dNTP-Mischung [10 mM], 1 µl Advantage[®] 2 Polymerase Mix [50x] sowie 34 µl Wasser.

2.11: Methoden zur Klonierung der 4-Cumarat:CoA Ligase

Für die Klonierung der 4CL wurde ebenfalls von heterologem Genmaterial ausgegangen. Zum Durchsuchen einer Lambda gt-10- sowie der fraktionierten cDNA-Bank von *Coleus blumei*, wurde der durch Fritzmeier et al. (1987) aus *Solanum tuberosum* isolierte cDNA-Klon pKA5, sowie 4CL-Klone aus *Glycine max*, *Nicotianum tabacum* und *Petroselinum crispum* verwendet. Die Sequenzen der eingesetzten Sonden sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Sonde	Sequenz / Literaturangabe zum Klon	Hybridisierungstemperatur
pKA5	Fritzmeier et al. 1987 (<i>Solanum tuberosum</i>)	50 - 60 °C
4CL14+16	Uhlmann und Ebel 1993 (<i>Glycine max</i>)	50 - 60 °C
4CL-1+2	Douglas et al. 1987 (<i>Petroselinum crispum</i>)	50 - 60 °C
St4cl-1+2	Becker-Andre et al. 1991 (<i>Solanum tuberosum</i>)	50 - 60 °C
4CL1+2	Lee und Douglas 1996 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	50 - 60 °C
4CL-Kons.1	GYGTKGCICAVCARGTIGAYGG	50 - 60 °C
4CL-Kons.2	GYGGDACIGTIGTDMG	50 - 60 °C

Tab. 10: Sequenzen und Hybridisierungstemperaturen der für die Klonierung der 4CL verwendeten Sonden. Siehe 2.5.1.9 - Zur Markierung der Sonden, 2.5.1.10 - Filterhybridisierung und 2.5.3.7 - Transferieren der Phagen-DNA auf Nylonmembranen
N=A,C,G,T; B=C,G,T; D=A,G,T; H=A,C,T; V=A,C,G; K = G,T; M = A,C; R= A,G
S=C,G; W=A,T; Y=C,T; I= Inosin

Ebenfalls wurden anhand von Sequenzvergleichen an 4CL-Klonen aus Gendatenbanken Oligonukleotidsonden aus Konsensusbereichen erstellt und zum Durchsuchen der cDNA-Banken verwendet. Die Sequenz dieser Sonden (4CL-Kons.1+2) ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Ein weiterer Ansatz war es, mit von Brian Ellis (Department of Plant Science, Vancouver) für die Klonierung der 4CL verwendeten Primern eine PCR durchzuführen. Zusätzlich wurden PCR-Primer anhand von Konsensussequenzen entwickelt und für PCR sowie RT-PCR eingesetzt.

Tabelle 11 zeigt die Sequenzen der PCR-Primer.

Sonde	Sequenz
Ellis 1 a	CGGAATTCGRTCIAARCTICIGAYAT
Ellis 1 b	CGGAATTCGRTCIAARTTRCCIGAYAT
Ellis 2 a	GCTCTAGAGARTADATRTGRAAIAGRGG
Ellis 2 b	GCTCTAGAGARTADATRTGRAAYAARGG
4CL-1 F	AAAGGWGTSATGYTGACKCAC
4CL-1 R	CYTTYCTMAADATYTTYCC

Tab. 11: Für die PCR verwendete Primer. F steht für die normale Leserichtung (forward), R für den entsprechenden Primer in Gegenrichtung (reverse). Die Sequenz steht hier immer in 5' - 3' Richtung. **N=A,C,G,T; B=C,G,T; D=A,G,T; H=A,C,T; V=A,C,G; K = G,T; M = A,C; R= A,G S=C,G; W=A,T; Y=C,T; I= Inosin**

Komponente	Endkonzentration im PCR-Ansatz (50 µl)	
	Nach Ellis	Variationen
10x PCR Puffer	1x konzentriert	1x Konzentriert
dNTP .- Mix	200 µM jedes dNTPs	200 µM jedes dNTPs
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 - 3 mM
Primer A	0.1 µM	0.1-0.5 µM
Primer B	0.1 µM	0.1-0.5 µM
Matrizen-DNA	0.25 µg	0.25-1 µg
Steriles Wasser	Variabel	Variabel
Polymerase	1 unit	1 / 2.5 units

Tab. 12: PCR-Bedingungen. Als PCR-Puffer wurde der vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet. Die Mg²⁺ Konzentration wurde erhöht, wenn eine bessere Primerbindung gewünscht war und erniedrigt, sofern eine höhere Spezifität erreicht werden sollte. Eine hohe Primerkonzentration wurde bei stark degenerierten Primern eingesetzt. Eine hohe Konzentration an Matrizen-DNA wurde vor allem bei genomischer DNA eingesetzt, um die Chance ein Transkript zu erhalten, zu erhöhen. PCR-Ansätze, die nicht mit Hot-StarTM-Taq angesetzt wurden, wurden grundsätzlich auf Eis pipettiert und erst nach Erreichen der Anfangstemperatur des PCR Zyklus in das Gerät eingesetzt.

Die PCR wurde zum einen nach den Angaben von Ellis (persönliche Mitteilung), und zum anderen mit eigenen Modifikationen durchgeführt (Tab 12). Die Zyklenparameter sind in Tabelle 13 aufgeführt, wobei das Programm mit der Primerkombination Ellis1 und Ellis2 den Angaben von Ellis entspricht.

Primer-kombination	Denaturierung		Annealing		Extension		Zykluszahl		
	°C	min.	°C	Sek.	°C	min.			
Ellis 1a+b	95 °C	1 min.	50 °C	50 Sek.	72 °C	1 min.	32	3	
Ellis 2a+b		1 min.		55 °C		50 Sek.		1 min.	30
		1 min.				50 Sek.		10 min.	1
4CL-1 F	95 °C	1 min.	50 °C	50 Sek.	72 °C	1 min.	32	3	
4CL-1 R		1 min.		55 °C		50 Sek.		1 min.	30
		1 min.				50 Sek.		10 min.	1
4CL-1 F	95 °C	15 / 5 min.	45 °C	2 min.	72 °C	1 min.	32	1	
4CL-1 R		1 min.		bis		2 min.		1 min.	30
		1 min.		55 °C		3 min.		10 min.	1

Tab. 13: Zyklenparameter für die PCR und RT-PCR mit Primern für die 4CL. Die RT-Reaktion wurde wie in 3.8.3.3 beschrieben durchgeführt.

2.12: Sequenzierungen

Die Sequenzierungen der erhaltenen Klone wurden für die Klone PAL-1, PAL-2, RAS-4 und RAS-5 bei der Firma Eurogentech durchgeführt. Alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Klone wurden am Institut für Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Maier sequenziert.

3: Ergebnisse:

3.1: Charakterisierung der Suspensionskultur Col. 20

Die Suspensionskultur Col. 20 befand sich zum Zeitpunkt ihrer Charakterisierung in der 18. Passage. Charakterisiert wurde über eine Periode von 13 Tagen, um Näheres über die Enzymaktivität von RAS und PAL im Verlauf der Kulturperiode zu erfahren und um später Expressionsstudien durchführen zu können.

3.1.1: Mediumsparameter:

Der pH-Wert im Medium der Kultur Col. 20 verhielt sich für CB2- und für CB4-Medium weitgehend gleich, wobei der pH in CB2-Medium beginnend vom fünften Tag etwas höher lag als in CB4. Die Änderungen des pH-Wertes über den Kulturverlauf sind in Abbildung 9 dargestellt.

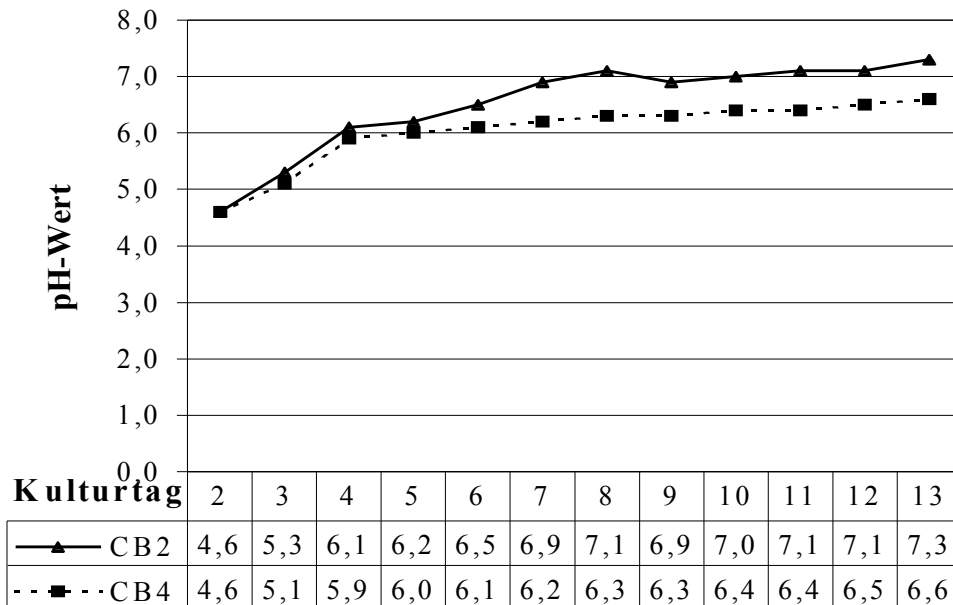


Abb. 9: Änderungen des pH-Wertes im Medium der Kultur Col. 20 über einen Zeitraum von 13 Tagen. Die erste Messung erfolgte am zweiten Tag nach dem Überimpfen von 20 ml einer Vorkultur in CB2-Medium zu je 50 ml frischem Medium (CB2 oder CB4)

Der Zuckergehalt im Medium (Abb. 10) nahm während der Kulturperiode kontinuierlich ab und erreicht ein gleichbleibend niedriges Niveau in CB2 ab dem fünften und in CB4 ab dem achten Kulturtag.

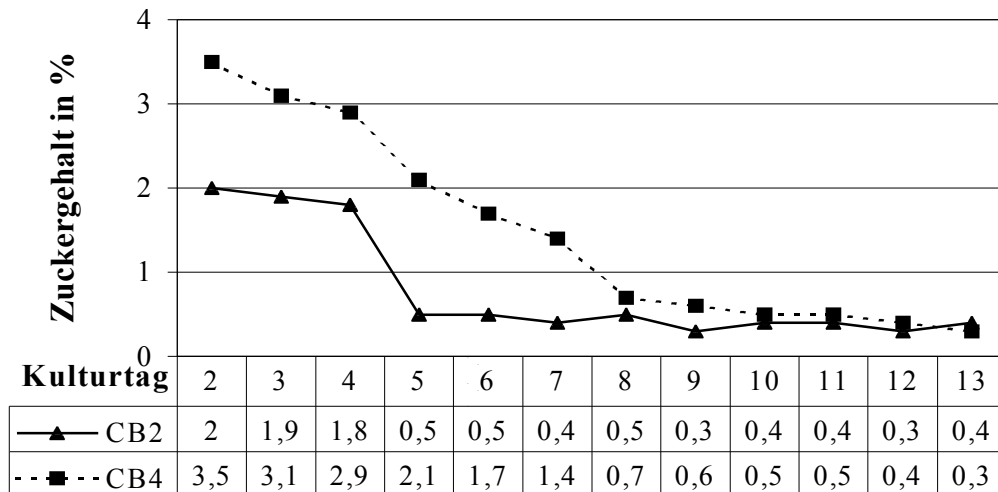


Abb. 10: Zuckergehalt im Medium der Suspensionskultur Col. 20. Der Zuckergehalt wurde über eine Messung des Brechungsindex per Handrefraktometer im Medium nach Absaugen der Zellen bestimmt.

Die Leitfähigkeit des Mediums (Abb. 11) nahm für CB2 wie auch für CB4 mit kontinuierlichem Verbrauch der Ionen ab. Ab dem neunten Tag war für CB2 im Gegensatz zu CB4 ein erneuter Anstieg der Leitfähigkeit zu beobachten, der wahrscheinlich mit der Absterbephase der Zellen und damit einher gehender erneuter Ionenfreisetzung zusammenhängt.

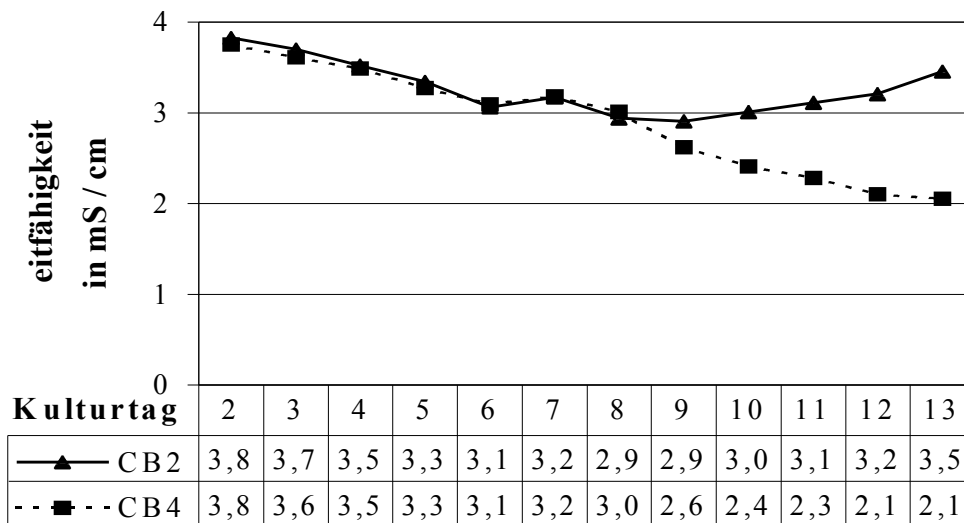


Abb. 11: Leitfähigkeit des Mediums bei Col. 20. Die Leitfähigkeit wurde mit einem Konduktometer direkt im Medium oder in geeigneter Verdünnung des Mediums mit destilliertem Wasser nach Absaugen der Zellen bestimmt.

3.1.2: Wachstum:

In den Kulturen in CB2-Medium stieg das Frischgewicht der Zellen wie in Abbildung 12 dargestellt bis zum sechsten Kulturtag an. Das Frischgewicht blieb von diesem Zeitpunkt an bis zum zehnten Tag weitgehend konstant, um ab dem elften Tag wieder abzunehmen. Für die in CB4 gezogene Kultur ergab sich ein ähnlicher Verlauf, jedoch mit einer Frischgewichtszunahme bis zum achten Tag. Das Frischgewicht blieb bis zum 11. Tag konstant, danach war eine Verringerung des Frischgewichtes zu beobachten.

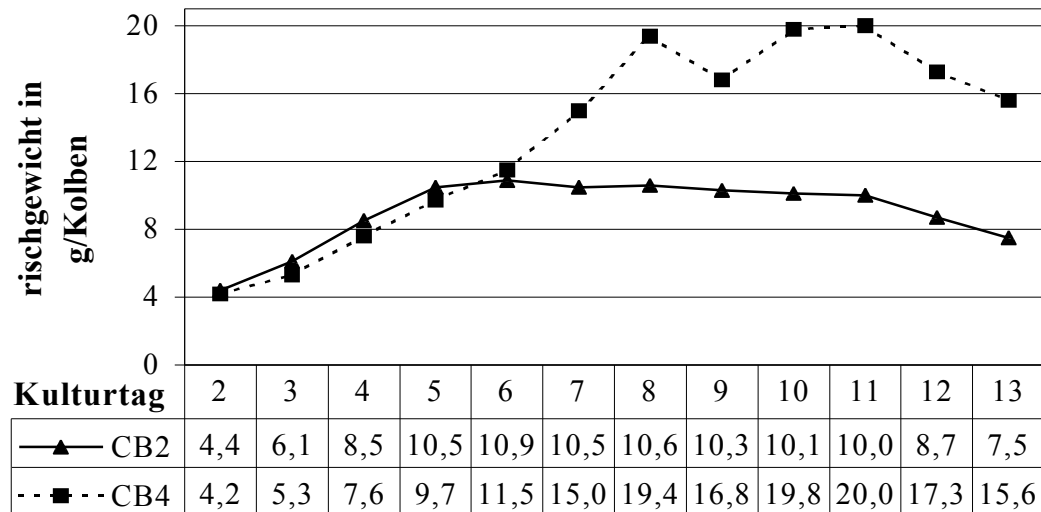


Abb. 12: Frischgewichtsänderungen der Kultur Col. 20 in CB2- sowie CB4-Medium. Das Gewicht wurde als Mittelwert mehrerer Kolben aus abgesaugten Zellen (siehe 2.7.2.1) bestimmt.

Betrachtet man das Wachstum der Kultur anhand des Trockengewichtes, dessen Veränderung über den Verlauf der Kulturperiode in Abbildung 13 dargestellt ist, wird deutlich, dass die hauptsächliche Trockengewichtsakkumulation der in CB2-Medium angezogenen Kultur bis zum vierten Tag anhielt, während die Trockengewichtsakkumulation in der in CB4-Medium angezogenen Kultur bis zum sechsten Tag andauert. Danach erfolgte in CB4 eine kontinuierliche Abnahme des Trockengewichtes. Für die in CB2 gewachsene Kultur erfolgte die Gewichtsabnahme bereits vom vierten Kulturtag an.

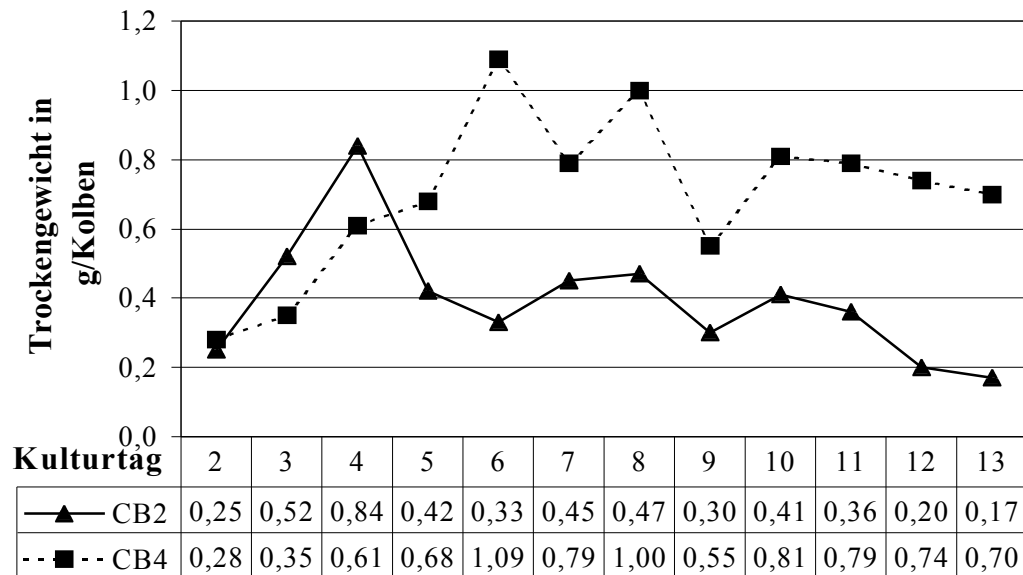


Abb. 13: Trockengewichtsänderungen der Kultur Col. 20 in CB2- und CB4- Medium. Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte nach Gefriertrocknung der Zellen.

3.1.3: Rosmarinsäureakkumulation:

Die Rosmarinsäureakkumulation setzte bei den Zellen in CB2- sowie in CB4-Medium ab dem vierten Kulturtag ein, stieg danach für die in CB2-Medium angezogene Kultur bis zum sechsten Tag an, um anschließend ein relativ konstantes Niveau zu halten. Im Maximum betrug der RA-Gehalt 1.88 % des Trockengewichtes. Der Verlauf der RA-Akkumulation ist in Abbildung 14 dargestellt.

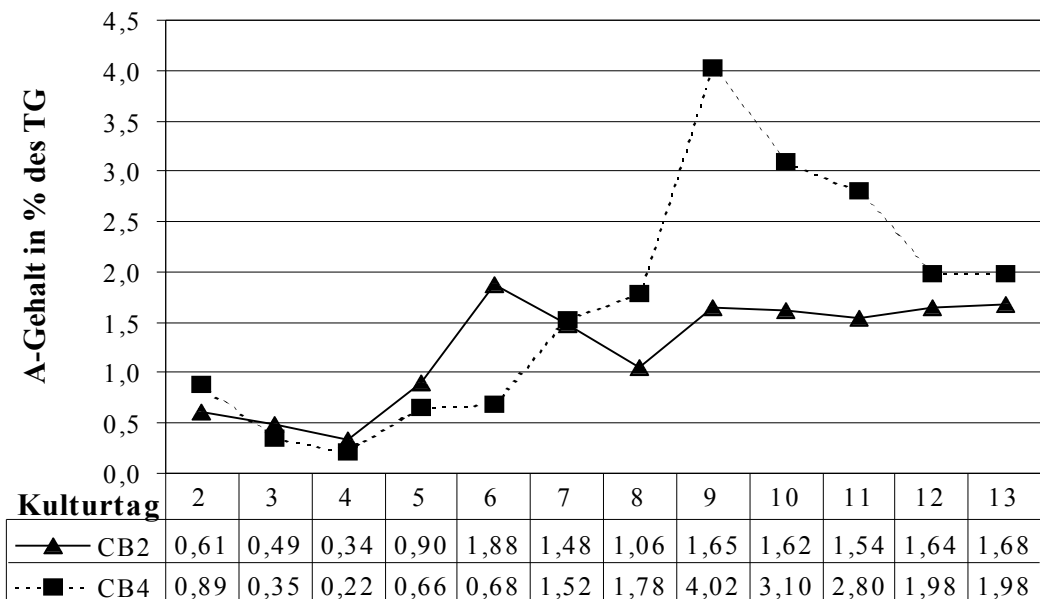


Abb. 14: Rosmarinsäuregehalt in % des Trockengewichtes bei der Kultur Col. 20. Die Rosmarinsäuregehalte wurden wie in 2.7.3.1 beschrieben bestimmt.

Der Anstieg des RA-Gehaltes in Zellen aus CB4-Medium erfolgte vom vierten zum achten Kulturtag hin zunächst recht langsam, um dann zum neunten Kulturtag stark anzusteigen. Vom zehnten bis zum dreizehnten Kulturtag fiel der Spiegel an RA wieder ab. Der höchste Gehalt an Rosmarinsäure wurde am neunten Tag erreicht und betrug 4.02 %.

3.1.4: Enzym-Aktivitäten

3.1.4.1: Aktivität der Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL)

Die PAL-Aktivität, hier gemessen ab dem vierten Kulturtag, zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen Proteinextrakten aus CB2- und CB4-Medium (Abb. 15). Die maximale, in Zellen aus CB2-Medium erreichte Enzymaktivität lag mit 8.6 $\mu\text{kat} / \text{kg}$ nur bei ca. einem Siebtel der in Proteinextrakten aus CB4-Medium am siebten Tag erreichten Enzymaktivität.

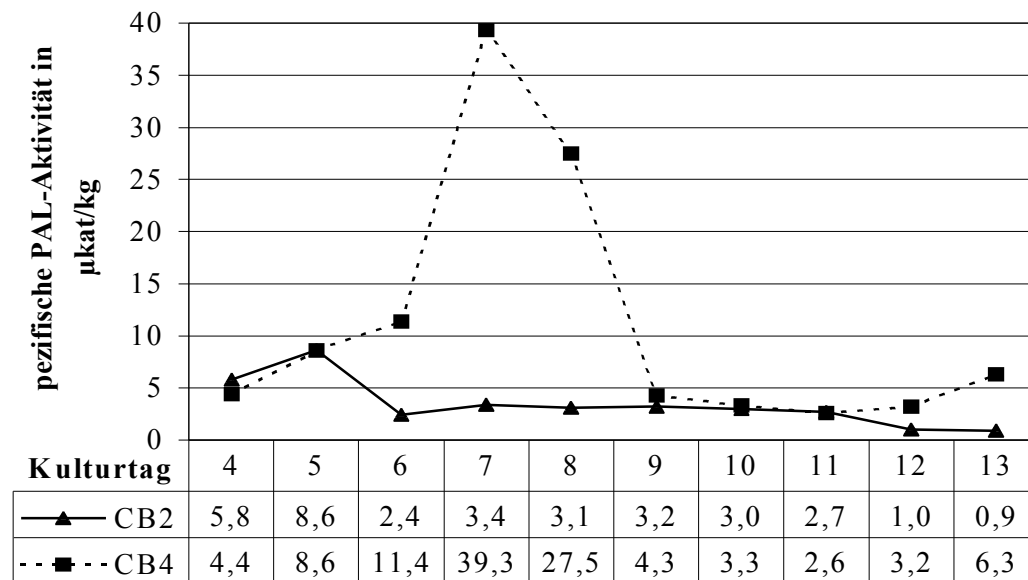


Abb. 15: Spezifische PAL-Aktivität in Proteinextrakten aus Col. 20-Suspensionskulturen. Die Enzymaktivitäten wurden wie in 2.7.4.1 beschrieben bestimmt.

In Extrakten aus CB4-Medium war hier, im Gegensatz zu Extrakten aus CB2-Medium, eine deutlich ausgeprägte Steigerung gegenüber dem kontinuierlich niedrigen Grundniveau zu beobachten. Die höchste, in Extrakten der in CB4-Medium gewachsenen Zellen gemessene PAL-Aktivität, lag in dieser Messung an Tag 7 bei 39.3 $\mu\text{kat} / \text{kg}$. Die höchste Aktivität in Extrakten aus in CB2-Medium angezogenen Zellen, wurde an Tag 5 mit 8.6 $\mu\text{kat} / \text{kg}$ gemessen.

3.1.4.2: Aktivität der Rosmarinsäuresynthase (RAS)

Die spezifische Aktivität der RAS stieg in Kulturen aus CB2-Medium ausgehend vom zweiten Tag kontinuierlich an, um am siebten Tag ihr Maximum bei 44.4 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ zu erreichen (siehe Abb. 16). In der CB4-Kultur wurde das Maximum der RAS-Aktivität ebenfalls am siebten Kulturtag erreicht. Die maximale spezifische Aktivität betrug hier 121 $\mu\text{kat}/\text{kg}$. Ausgehend vom siebten Kulturtag fielen für die

Zellen in CB2- wie auch in CB4-Medium die Aktivitäten erneut bis zum Kulturrende ab.

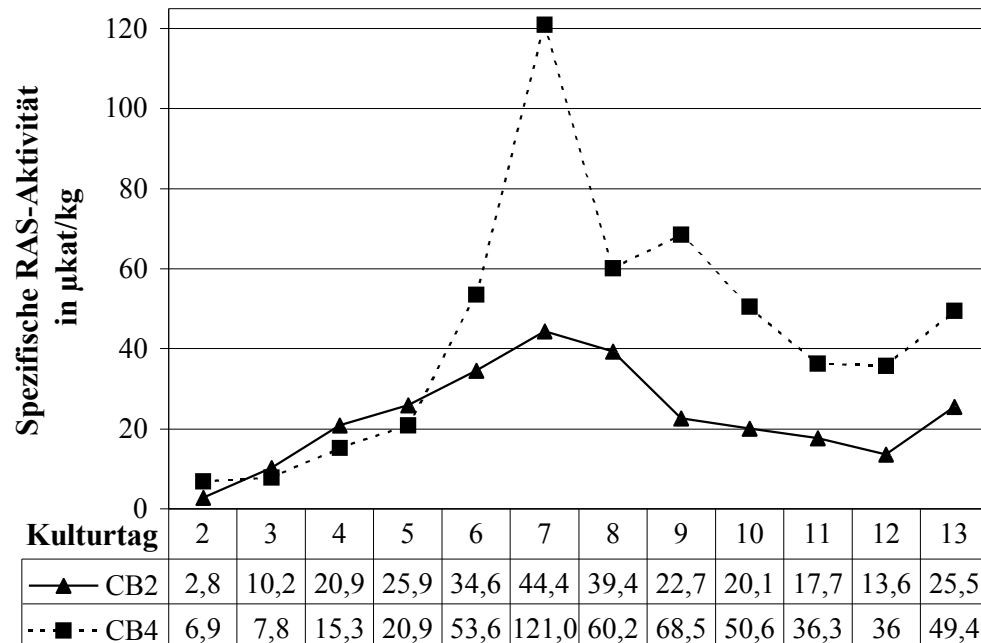


Abb. 16: Spezifische RAS-Aktivität in Proteinextrakten aus der Suspensionskultur Col. 20 in CB2- und CB4-Medium. Die Enzymaktivität wurde wie in 2.7.4.2 beschrieben bestimmt.

3.2: Charakterisierung der Kultur Col. M1

Die Kultur Col. M1 wurde in Marburg angelegt. Die Charakterisierung diente vorrangig der Untersuchung der RAS-Aktivität in Proteinextrakten aus Zellen die in Medien mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen (CB4, CB5, CB6) angezogen wurden. Ziel der Charakterisierung war es, herauszufinden, in welchem Medium und zu welchem Zeitpunkt in der Kulturperiode die RAS-Aktivität am stärksten ausgeprägt war. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte der beste Zeitpunkt zur Isolation von Zellen zur Reinigung der Rosmarinsäuresynthase ermittelt werden. Dazu wurde im Verlauf der Charakterisierung die RA-Akkumulation im Zusammenhang mit der RAS-Aktivität untersucht. Die Kultur befand sich zum Zeitpunkt der Charakterisierung in der zehnten Passage.

3.2.1: Wachstum

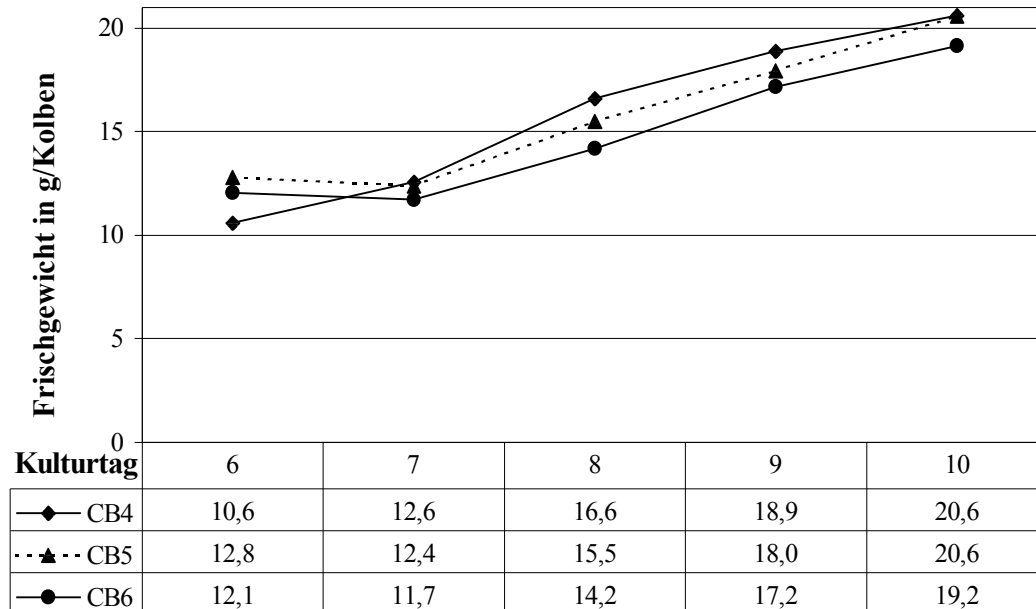


Abb. 17: Frischgewichtsveränderung im Kulturverlauf der Suspensionskultur Col. M1 in CB4-, CB5- und CB6-Medium. Das Frischgewicht wurde wie in 2.7.2.1 beschrieben als Mittelwert mehrerer Kolben bestimmt.

Hierbei ergaben sich Ergebnisse für die Wachstumsparameter, die denen der Charakterisierung der Kultur Col. 20, siehe 3.1, weitgehend entsprechen. Abbildung 17 zeigt die Frischgewichtsakkumulation und Abbildung 18 die Trockengewichtsakkumulation im Verlauf der Kulturperiode.

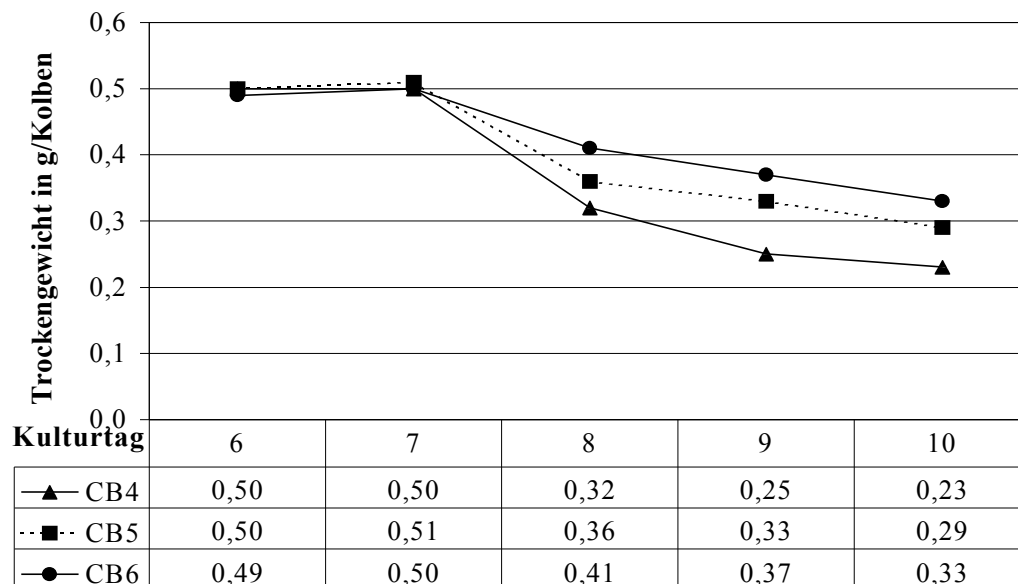


Abb. 18: Trockengewichtsveränderung in CB4-, CB5- und CB6-Medium bei der Kultur Col. M1. Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte wie in 2.7.2.2 beschrieben.

3.2.2: Rosmarinsäuregehalt und RAS-Aktivität:

Der Rosmarinsäuregehalt nahm bei Zellkulturen aus allen untersuchten Medien vom siebten Kulturtag an stark zu (Abbildung. 19). Bei der in CB2 angezogenen Kultur, die für diese Messungen zusätzlich herangezogen wurde, erfolgte dies bereits am sechsten Tag. Das Maximum wurde jeweils am neunten, bzw. am achten Kulturtag für die in CB2 gewachsene Kultur erreicht, wobei die RA-Akkumulation in den Zellen der in CB4-Medium gewachsenen Kultur am höchsten war.

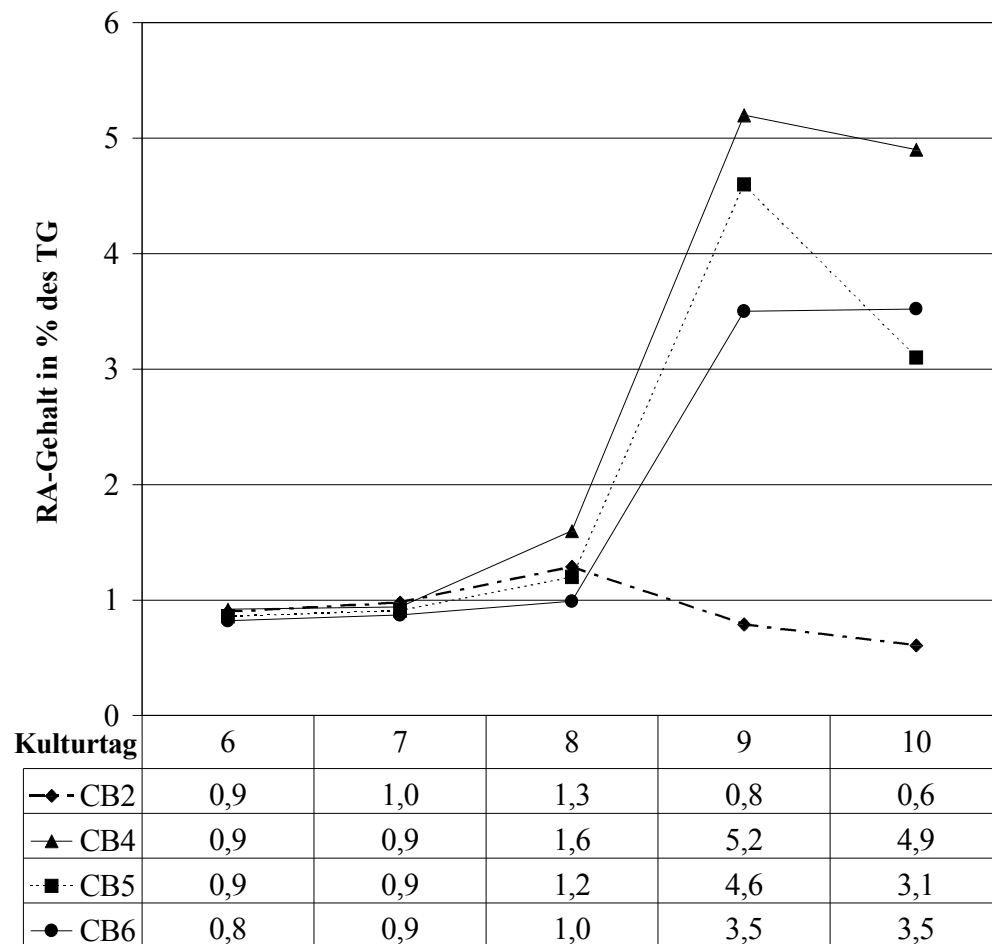


Abb. 19: Rosmarinsäure-Gehalt bei Col. M1 in CB2-, CB4-, CB5- und CB6 Medium.
Die Rosmarinsäuregehalte wurden wie in 2.7.3.1 beschrieben bestimmt.

Die maximalen RA-Gehalte lagen hier für Zellen aus CB2-Medium bei 1.29 %, für Zellen aus CB4 bei 5.2 %, für Zellen aus CB5 bei 4.6 % und für in CB6 gewachsene Zellen bei 3.5 % des Trockengewichtes.

Die RA-Akkumulation korreliert auch hier mit der RAS-Aktivität, die bei Zellen aus allen getesteten Medien ihren Höhepunkt am siebten Tag erreicht (siehe Abbildung 20). Nur kurze Zeit später begann in den Zellen die RA-Akkumulation.

Für die RAS-Aktivität ergaben sich keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Medien (Abb. 20). Im Einklang mit der RA-Akkumulation zeigte sich hier in Extrakten aus in CB4-Medium gewachsenen Zellen die höchste RAS-Aktivität, die sich aber nicht wesentlich von den Aktivitäten in CB5 und CB6 angezogenen Zellen unterscheidet. Das Aktivitätsmaximum lag für die in CB4 gezogene Kultur

bei 92 $\mu\text{kat}/\text{kg}$, für die in CB5 gezogene Kultur bei 92 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ und für die in CB6 gezogene Kultur 90 $\mu\text{kat}/\text{kg}$.

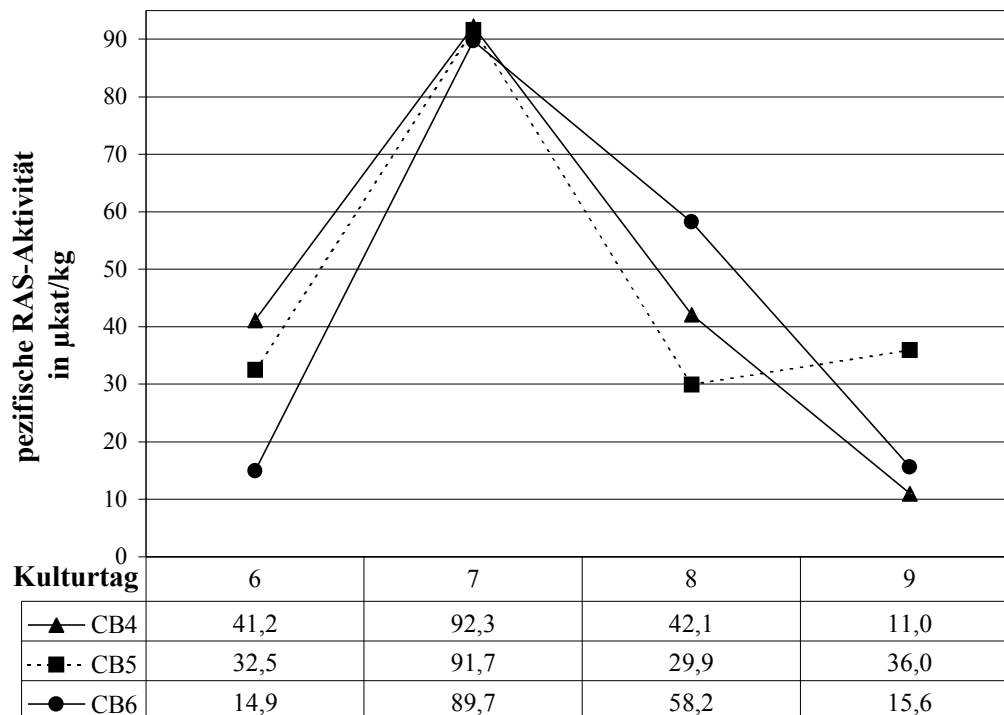


Abb. 20: Spezifische RAS-Aktivität in Proteinextrakten der Kultur Col. M1. Die Enzymaktivität wurde wie in 2.6.4.2 beschrieben bestimmt.

Die günstigsten Bedingungen für eine Proteinisolation, mit dem Zweck der Aufreinigung der Rosmarinsäuresynthase, ergaben sich also für die Kultur Col. M1 bei einer Anzucht in CB4-Medium und einer Ernte des Zellmaterials am siebten Kulturtag. Mediumsparameter und andere Enzymaktivitäten wurden im Verlauf dieser Charakterisierung nicht bestimmt.

3.3: Charakterisierung der Kultur Col. M5

Die Charakterisierung der *Coleus*-Kultur M5 diente hauptsächlich dem Zweck, Expressionsstudien mit dem aus *Coleus* isolierten homologen PAL-Klon durchzuführen und den über RT-PCR erhaltenen möglichen RAS-Klon zu verifizieren. Für diese Studien wurde die sich zu diesem Zeitpunkt in der fünfzehnten Passage befindende Kultur Col. M5 ausgewählt, da mit steigender Passagenzahl die Induzierbarkeit der RA-Synthese durch erhöhte Zuckerkonzentration oft nachlässt. Die zuvor für die Proteinisolation verwendete Kultur Col. M1 erwies sich hierfür bereits als zu alt.

3.3.1: Mediumsparameter

Der pH-Wert im Medium der Kultur Col. M5 verhielt sich für CB2- wie für CB4-Medium weitgehend gleich. Ein ab dem fünften Tag leicht erhöhter pH-Wert im

CB2-Medium, wie er in der Kultur Col. 20 beobachtet werden konnte, trat hier ebenfalls ein wenig abgeschwächt auf. Die pH-Änderungen über den Kulturverlauf sind in Abbildung 21 dargestellt.

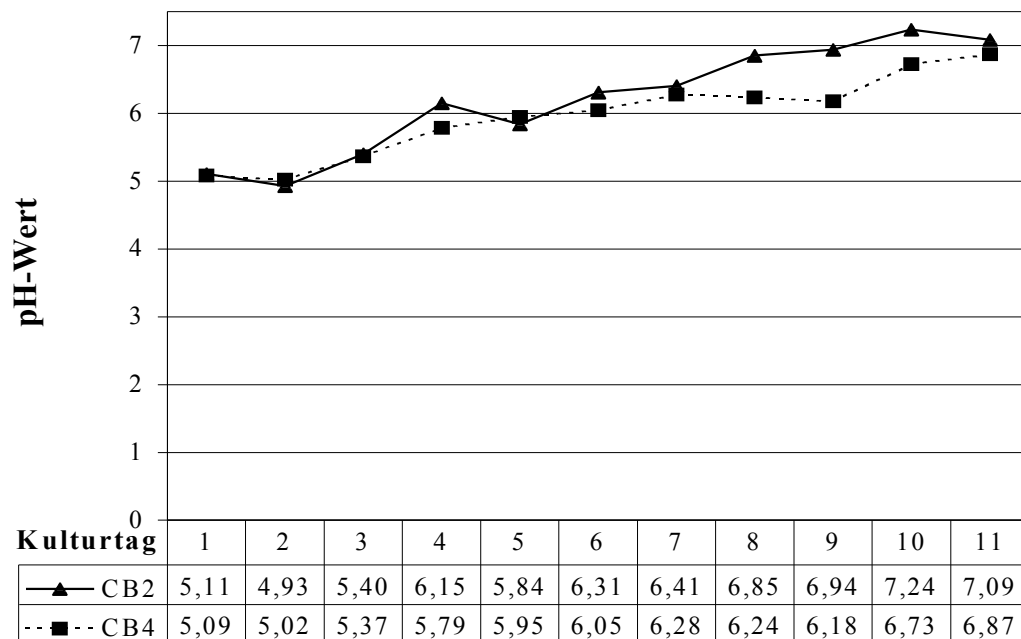


Abb. 21: Änderungen des pH-Wertes bei Col. M5 über einen Zeitraum von 11 Tagen. Die erste Messung erfolgte am ersten Tag nach dem Überimfen von 20 ml einer Vorkultur in CB2-Medium zu je 50 ml frischem Medium (CB2 oder CB4).

Der Zuckergehalt des Mediums nahm im Verlauf der Kulturperiode für beide Medien kontinuierlich ab (Abb. 22). Ein vollständiger Verbrauch des Zuckers im Medium wurde bei CB2 am fünften, und bei CB4 am achten Tag erreicht. Dieser Verlauf entspricht den für die Kultur Col. 20 ermittelten Werten.

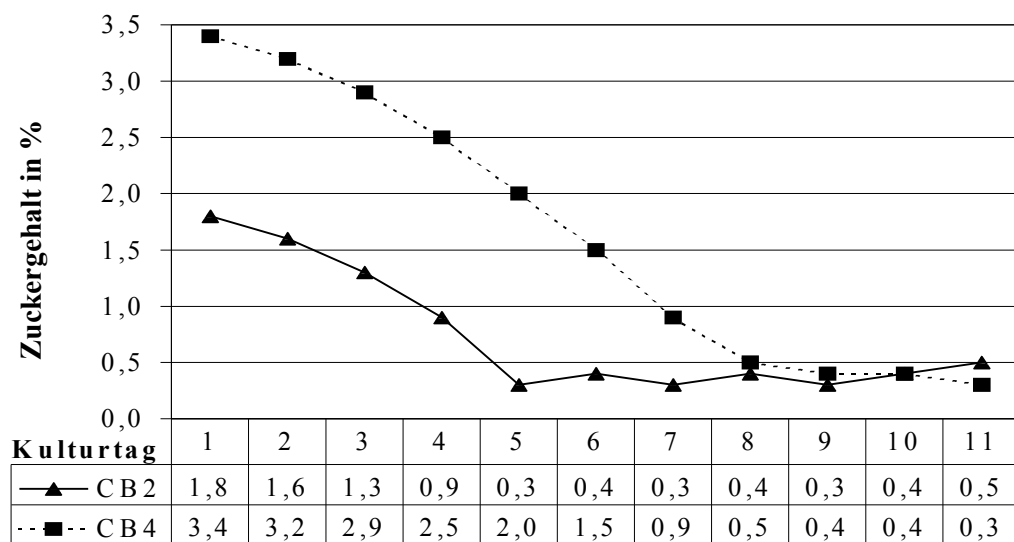


Abb. 22: Zuckergehalt im Medium bei der Kultur Col. M5. Der Zuckergehalt wurde über eine Messung des Brechungsindex per Handrefraktometer im Medium nach Absaugen der Zellen bestimmt.

Die Leitfähigkeit des Mediums (Abbildung 23) nahm von Beginn der Kulturperiode bis zum elften Tag in CB4-Medium kontinuierlich ab, in CB2-Medium war ab dem achten Kulturtag ein erneuter leichter Anstieg der Leitfähigkeit zu beobachten. Dieser Verlauf der Leitfähigkeitsänderung war nahezu identisch mit den für die Kultur Col. 20 bestimmten Werten.

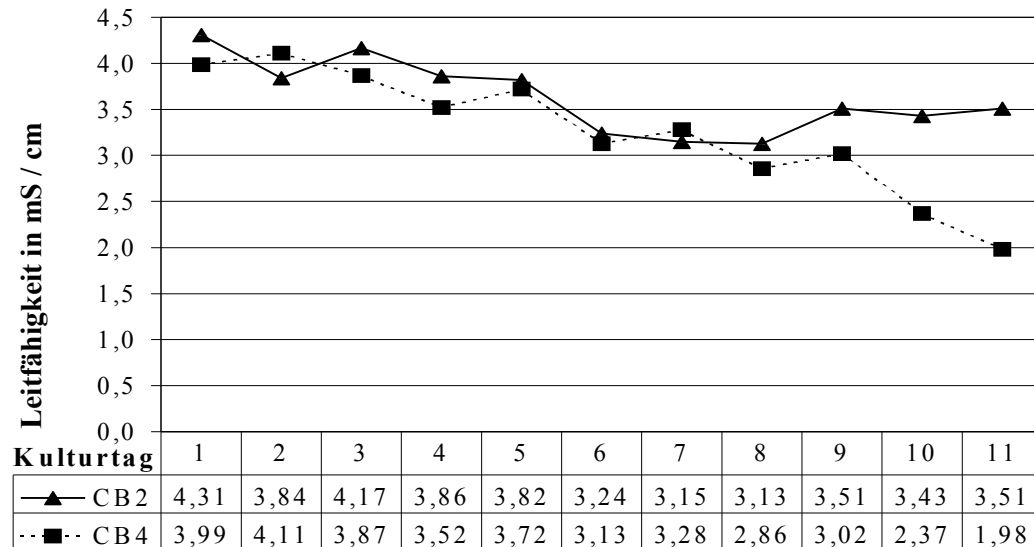


Abb. 23: Leitfähigkeit des Mediums bei Col. M5. Die Leitfähigkeit wurde mit einem Konduktometer direkt im Medium oder in geeigneter Verdünnung des Mediums mit destilliertem Wasser nach Absaugen der Zellen bestimmt.

3.3.2: Wachstum

Als Wachstumsparameter wurden für die Kultur Col. M5 Frisch- und Trockengewicht der Zellen bestimmt.

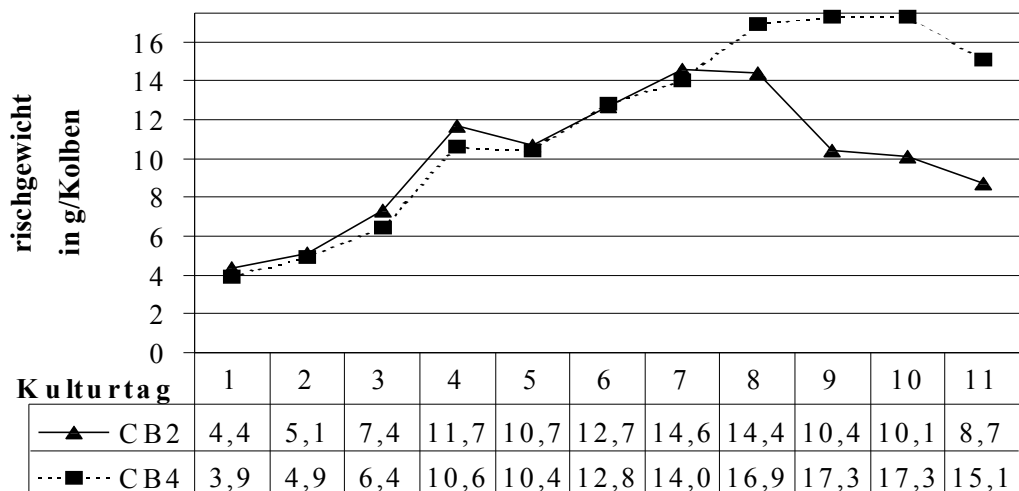


Abb. 24: Frischgewichtsänderungen bei Col. M5 in CB2- sowie CB4-Medium. Das Gewicht wurde als Mittelwert mehrerer Kolben aus abgesaugten Zellen (siehe 2.7.2.1) bestimmt.

Das Frischgewicht (Abbildung 24) bleibt hier in beiden Medien bis zum siebten Kulturtag nahezu identisch. Danach stieg es in CB4-Medium noch bis zum neunten Tag an, während es in CB2-Medium bereits ab dem achten Kulturtag wieder sank. Eine Verminderung des Frischgewichtes wurde für CB4-Medium erst nach dem zehnten Kulturtag beobachtet.

Auch bei der Trockengewichtsakkumulation (Abbildung 25) verlief der Gewichtsanstieg zunächst in beiden Kulturen parallel. Vom fünften auf den sechsten Kulturtag erfolgte allerdings eine starke Trockengewichtszunahme in CB4-Medium die das Trockengewicht pro Kolben auf das Doppelte des in CB2-Medium erreichten Trockengewichtes ansteigen liess.

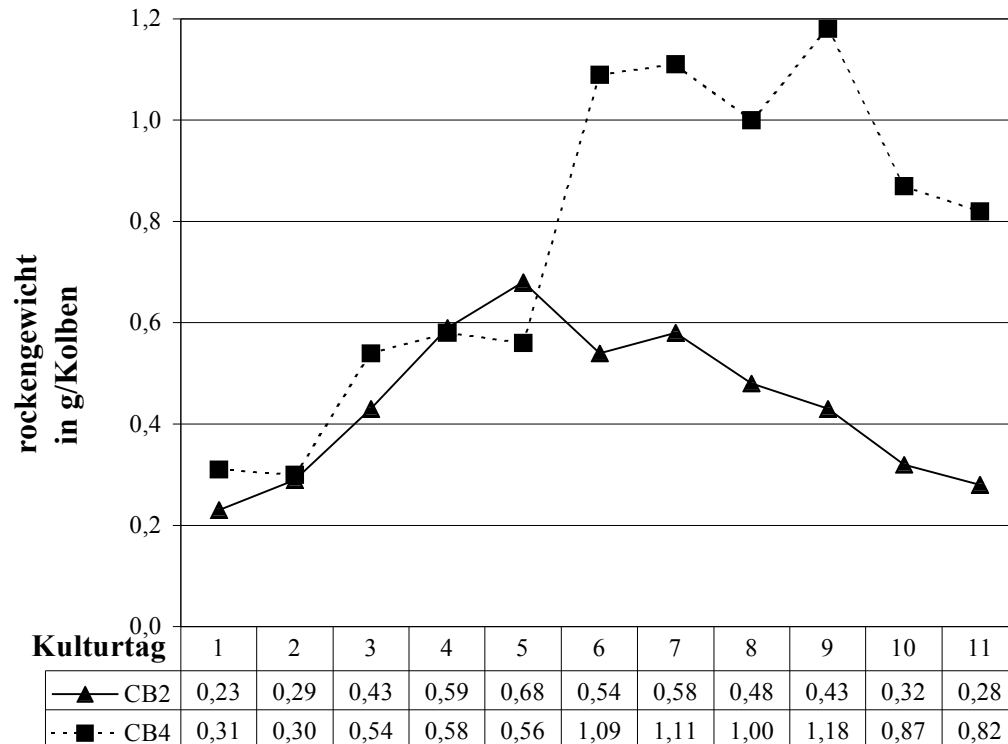


Abb. 25: Trockengewichtsänderungen bei Col. M5 in CB2- und CB4- Medium.
Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte wie in 2.7.2.2 beschrieben.

3.3.3: Rosmarinsäure- und Isorinsäure-Gehalt

Wenn die Aktivität der 3'-Hydroxylase, die zusammen mit einer 5'-Hydroxylase 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat geringer ist als die der Rosmarinsäuresynthese, kann es dazu kommen, dass zusätzlich zur Rosmarinsäureakkumulation auch Caffeoyl-4'-Hydroxyphenyllactat (Isorinsäure) akkumuliert wird. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den Abbildungen 26 (RA-Gehalt) und 27 (Isorinsäure-Gehalt) dargestellt.

Vergleichend liess sich beobachten, dass die Isorinsäure-Akkumulation in den Zellen synchron mit der RA-Akkumulation verlief und die Menge an Isorinsäure im Maximum etwa der Hälfte der RA-Menge entsprach. Die eigentliche Akkumulation begann für RA und Isorinsäure ab dem siebten Kulturtag mit einem leichten Anstieg zum achten Kulturtag und erreichte ihren Höhepunkt nach einem deutlichen Anstieg vom neunten auf den zehnten Tag.

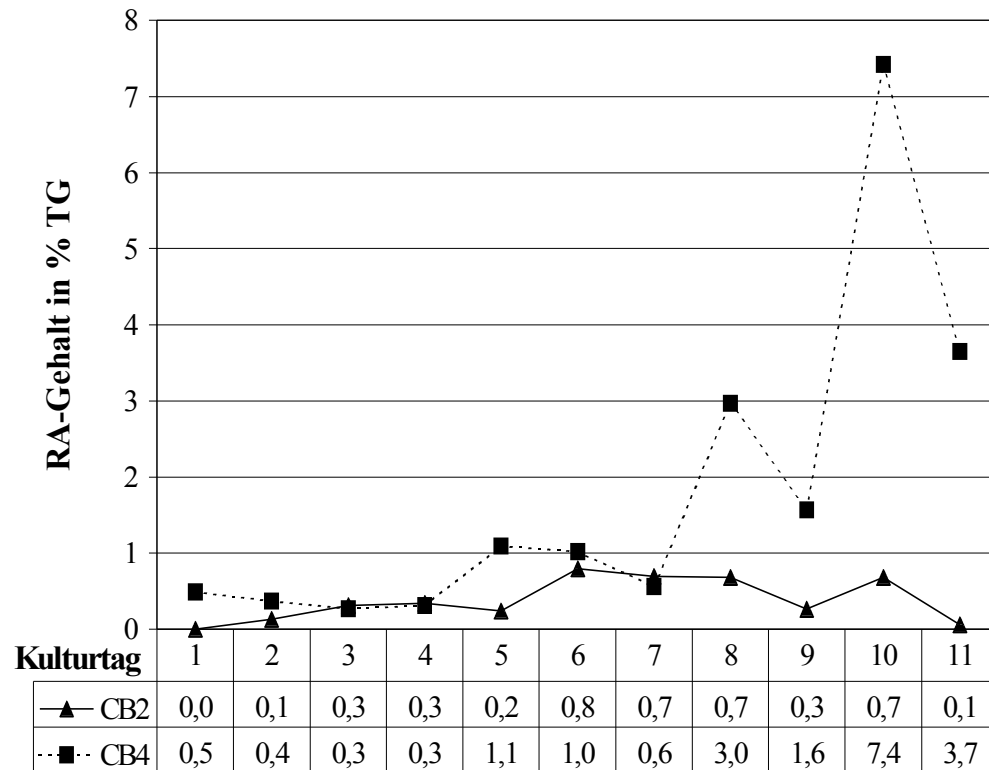


Abb. 26: Rosmarinsäuregehalt der Zellen in % des Trockengewichtes bei Col. M5.
Die Rosmarinsäuregehalte wurden wie in 2.7.3.1 beschrieben bestimmt.

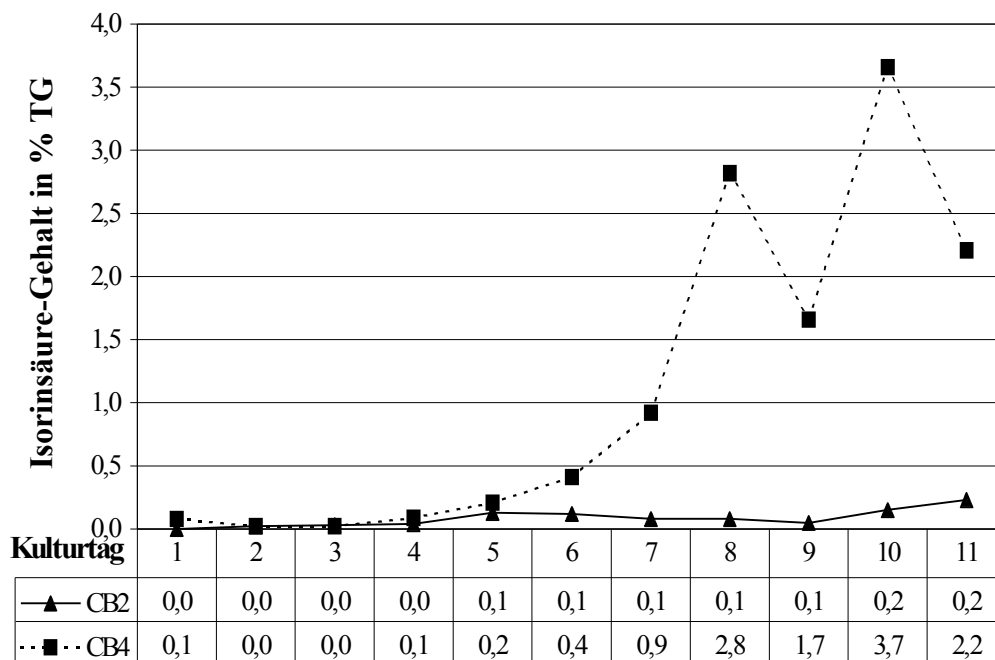


Abb. 27: Isorinsäure-Gehalt in % Trockengewicht in der Kultur Col. M5.
Die Gehalte wurden wie in 2.7.3.1 beschrieben bestimmt.

3.3.4: Enzymaktivitäten

3.3.4.1: PAL-Aktivität

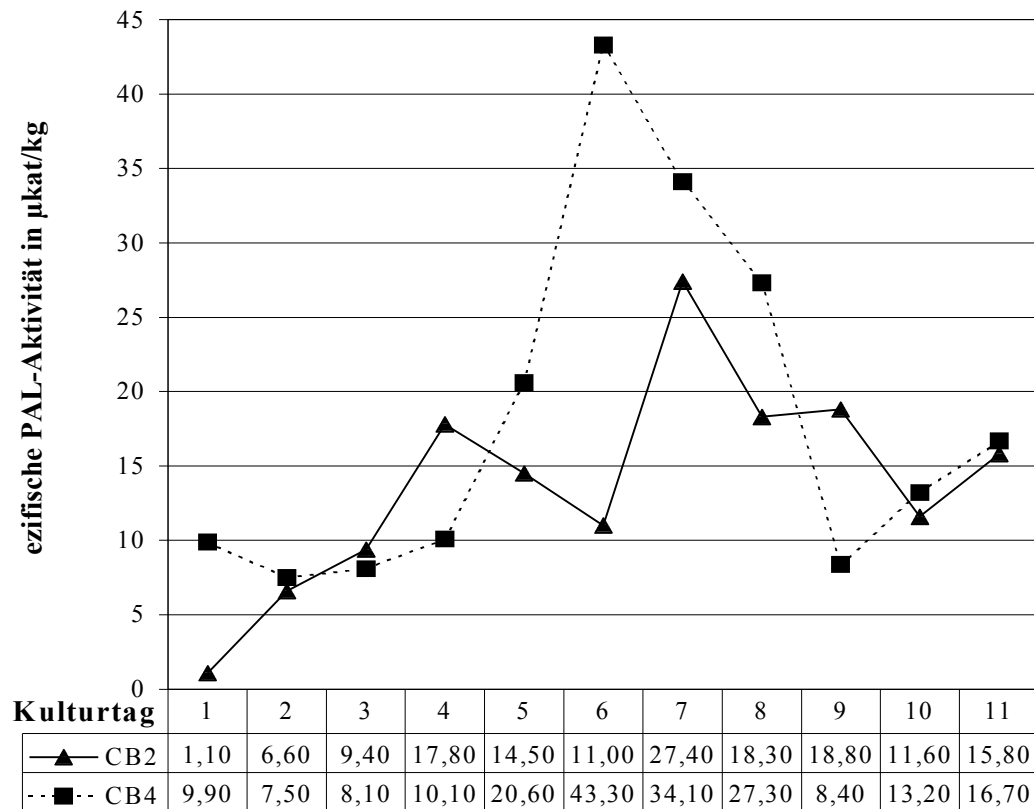


Abb. 28: Spezifische PAL-Aktivität in Proteinextrakten aus Zellen der Kultur Col. M5. Die Enzymaktivitäten wurden wie in 2.7.4.1 beschrieben bestimmt.

Für die in CB4-Medium gewachsenen Zellen stieg die PAL-Aktivität vom ersten Tag ausgehend kontinuierlich an um am sechsten Tag ihr Maximum zu erreichen und dann ähnlich steil wieder abzufallen (Abbildung 28). Der leichte Aktivitätsanstieg zum Ende der Kulturperiode hin, ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf geringe Proteinmengen im Enzymextrakt und somit verzerrte spezifische Aktivitäten zurückzuführen. Für die in CB2-Medium gewachsenen Zellen ergaben sich im Aktivitätsverlauf zwei Höhepunkte. Der erste, niedrigere, am vierten- und der zweite, höhere am siebten Kulturtag. Auch hier ist der leichte Anstieg der Aktivität zum Ende der Kulturperiode auf zu geringe Proteinmengen im Rohextrakt zurückzuführen.

Im Gegensatz zu der Kultur Col. 20 war die PAL-Aktivität der Col. M5 Kultur in Zellen aus CB2-Medium relativ hoch. Während bei Col. 20 bei in CB2-Medium gewachsenen Zellen nur gerade ein Siebtel von der in CB4-Medium angezogenen Zellen vorhandenen PAL-Aktivität erreicht wurde, erreichte die, bei Col. M5 in Proteinextrakten aus in CB2-Medium gewachsenen Zellen gemessene Enzymaktivität, etwa die Hälfte der in CB4-Medium gemessenen PAL-Aktivität.

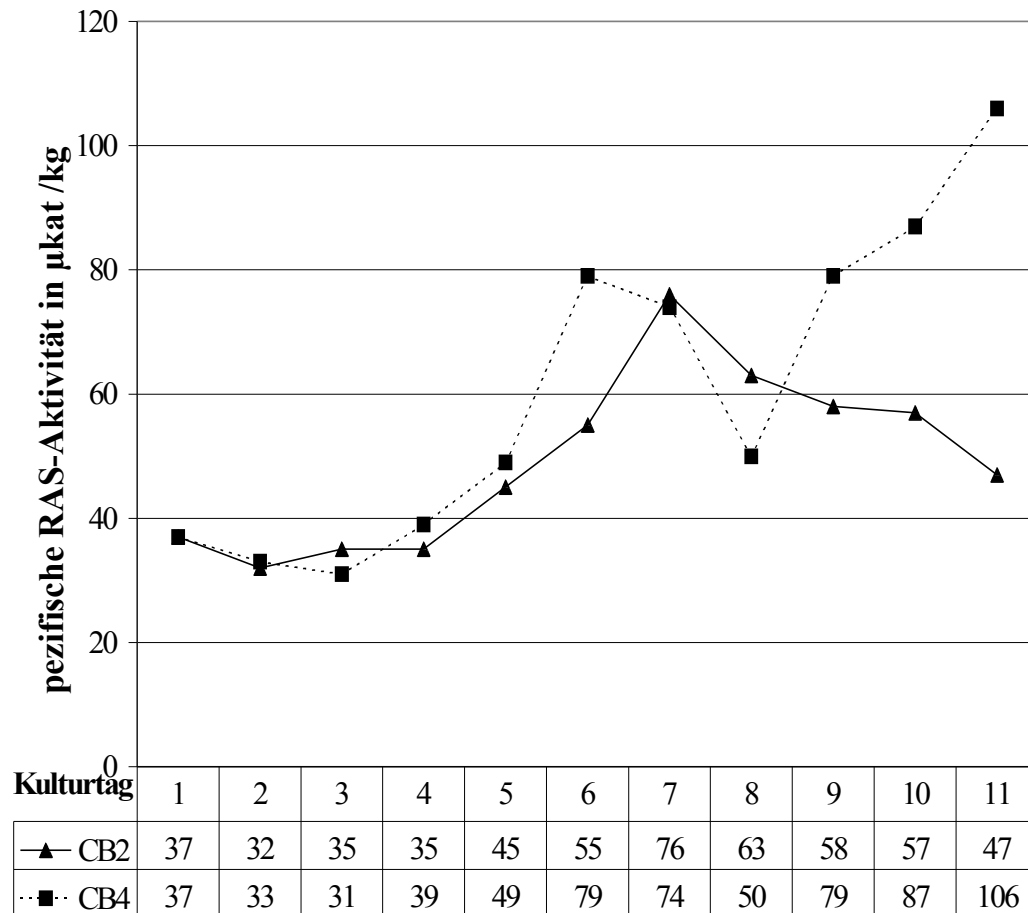
3.3.4.2: RAS-Aktivität

Abb. 29: Spezifische RAS-Aktivität in Proteinextrakten aus Zellen der Kultur Col. M5. Die Enzymaktivität wurde wie in 2.7.4.2 beschrieben bestimmt.

Die Aktivität der Rosmarinsäuresynthase blieb in Zellen aus beiden verwendeten Medien zunächst bis zum vierten Kulturtag auf relativ niedrigem Niveau, um dann in CB4 zum sechsten und in CB2 zum siebten Kulturtag hin anzusteigen. Während in Zellen aus CB2-Medium nach dem Erreichen der maximalen Aktivität am siebten Tag die Aktivität kontinuierlich sank, stieg nach einer kurzfristigen Aktivitätsminderung zwischen dem sechsten und achten Tag die RAS-Aktivität bei in CB4-Medium angezogenen Zellen bis zum elften Kulturtag noch einmal stark an. Der hier beobachtete Verlauf der Aktivitätsänderung ist ungewöhnlich und widerspricht den Ergebnissen der Charakterisierung der Kulturen Col. 20 und Col. M1, da sich für die RAS-Aktivität eigentlich immer ein deutliches Maximum am siebten Tag mit anschließendem Aktivitätsabfall zeigt.

3.4: Expressionsstudien

Zum Vergleich mit den, während der Charakterisierung der Kultur Col. M5 bestimmten Enzymaktivitäten von PAL und RAS, wurden zusätzlich zur Kulturcharakterisierung noch Expressionsstudien zur Verifizierung des in dieser Arbeit beschriebenen PAL-Klones PAL-19 sowie des möglichen RAS-Klones durchgeführt.

3.4.1: Expressionsmuster der PAL

Die in Enzymextrakten aus Zellen der Kultur Col. M5 gemessene PAL-Aktivität wurde anhand von Northern Slot Blots (Abb. 30) mit der Expressionsaktivität des in dieser Arbeit untersuchten PAL-Klones, PAL-19, verglichen.

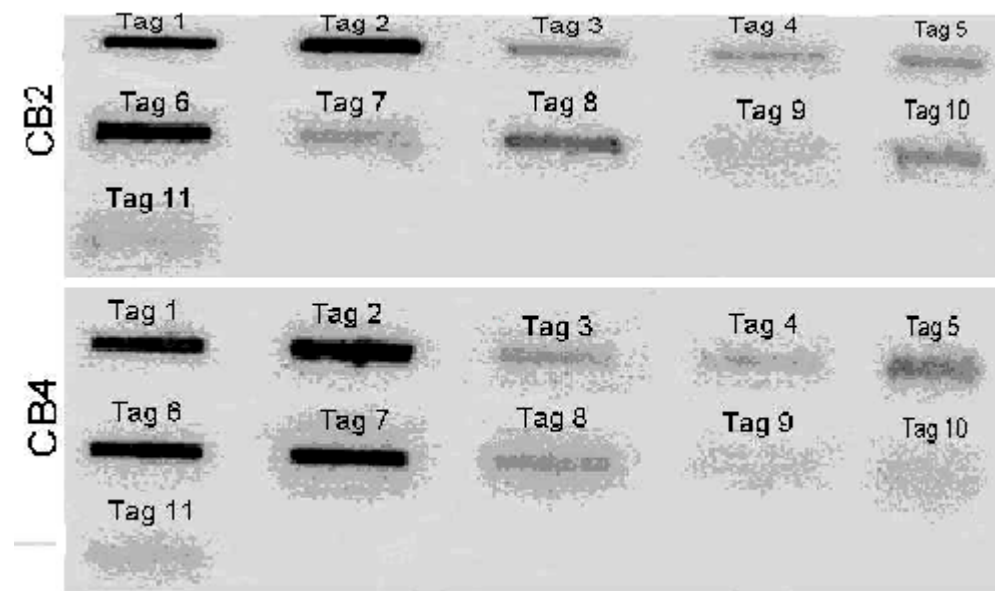


Abb. 30: Expressionsstudie für den PAL-Klon PAL-19 aus *Coleus blumei* mit aus der Kultur Col. M5 isolierter Gesamt-RNA. Es wurden pro Slot 10 µg RNA aufgetragen. Die Intensität des Signals wurde mit einem Bioimager ausgewertet. Der Aufbau des Slot Blots ist unter 2.6.1.8.3, die Hybridisierungsprozedur unter 2.6.1.10 beschrieben.

Trägt man die aus der Hybridisierung bestimmten Intensitäten der Signale gegen die Enzymaktivität auf, so ist zu beobachten, dass bei in CB2-Medium gewachsenen Zellen die RNA-Akkumulation immer etwa ein bis zwei Tage vor dem Anstieg der Enzymaktivität beginnt (Abbildung 31). Die höchste RNA-Akkumulation tritt hier am zweiten Tag auf, zwei Tage vor dem ersten Aktivitätspeak der PAL an Tag 4. Die einen Tag vor dem eigentlichen Aktivitätsmaximum der PAL auftretende zweite deutliche RNA-Akkumulation reicht nicht ganz an die Menge der am zweiten Tag detektierten RNA heran.

Für in CB4-Medium angezogene Zellen ergibt sich ein leicht verändertes Bild (Abbildung 32). Hier folgt auf den ersten Anstieg der RNA-Menge an Tag 2 zunächst keine Aktivitätssteigerung der PAL, während des folgenden deutlichen Aktivitätsanstieges mit einem Maximum am sechsten Kulturtag verlaufen die Zunahme der RNA-Akkumulation sowie der Anstieg der Enzymaktivität nahezu parallel.

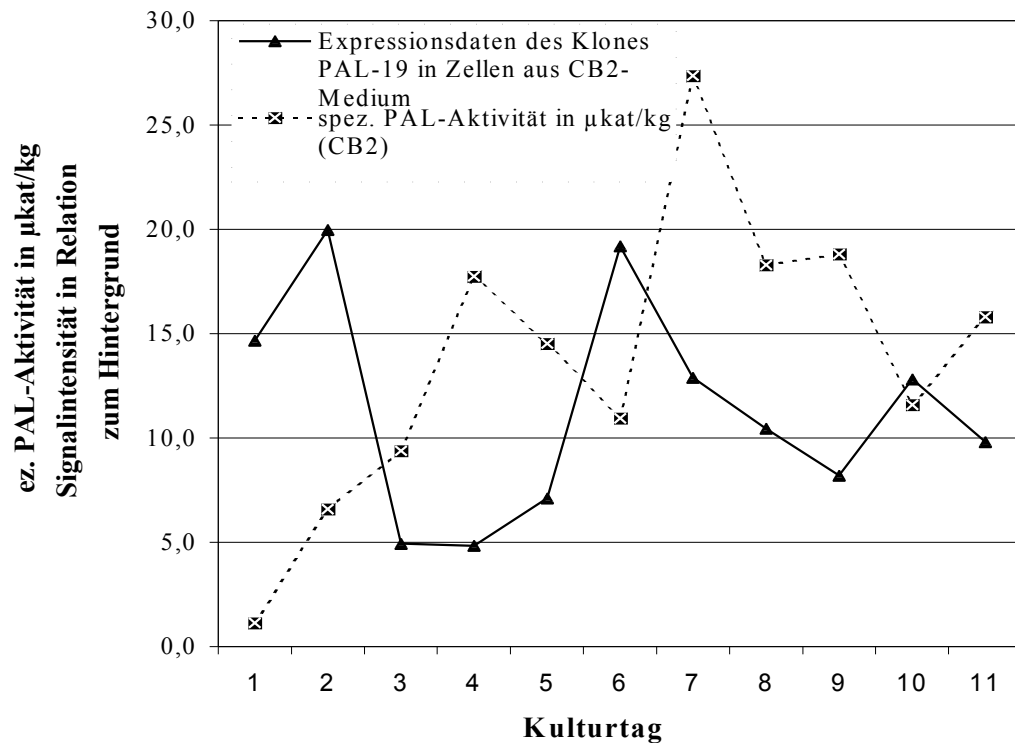


Abb. 31: Vergleich der PAL-spezifischen RNA-Akkumulation mit der Enzymaktivität der PAL bei in CB2-Medium gewachsenen Zellen der Kultur Col. M5. Die Werte für die RNA-Akkumulation wurden aus 4 unterschiedlichen Slot Blots gemittelt. Die hier dargestellten Intensitäten sind relativ zum Hintergrund des Blots angegeben

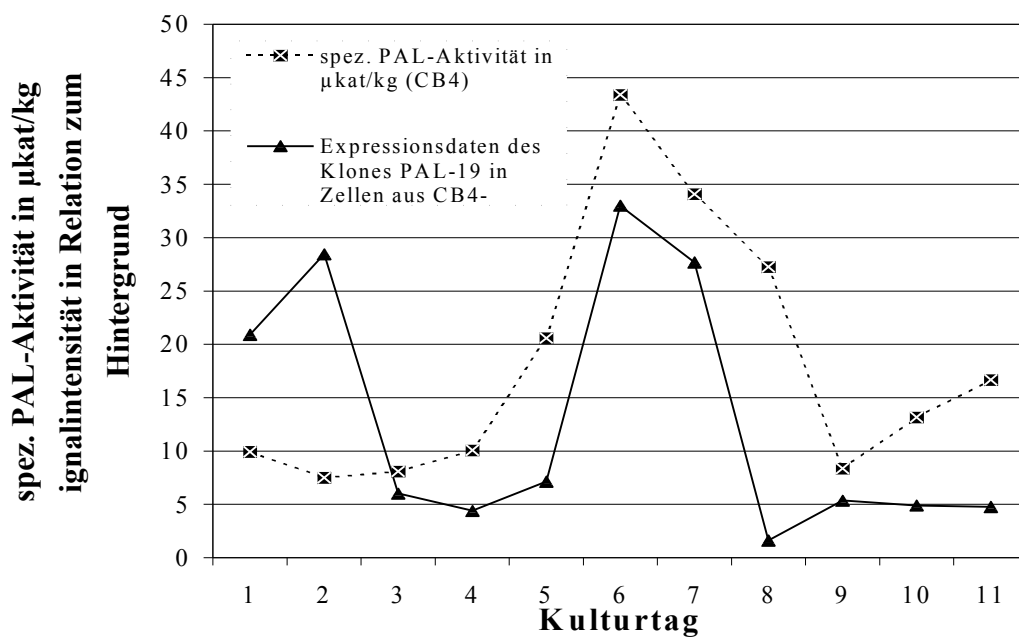


Abb. 32: Vergleich der PAL-spezifischen RNA-Akkumulation und der Enzymaktivität der PAL bei in CB2-Medium gewachsenen Zellen der Kultur Col. M5. Die Werte für die RNA-Akkumulation wurden aus 4 unterschiedlichen Slot Blots gemittelt. Die hier dargestellten Intensitäten sind relativ zum Hintergrund des Blots angegeben.

3.4.2: Expressionsmuster des möglichen RAS-Klons

Um festzustellen, ob es sich bei dem über RT-PCR isolierten DNA-Fragment RAS-1.1 um einen Klon der RAS handeln könnte, wurde die in Zellen der Kultur Col. M5 gemessene RAS-Aktivität an Hand von Northern Slot Blots (Abb. 33) mit der Expressionsaktivität des möglichen RAS Klones verglichen.

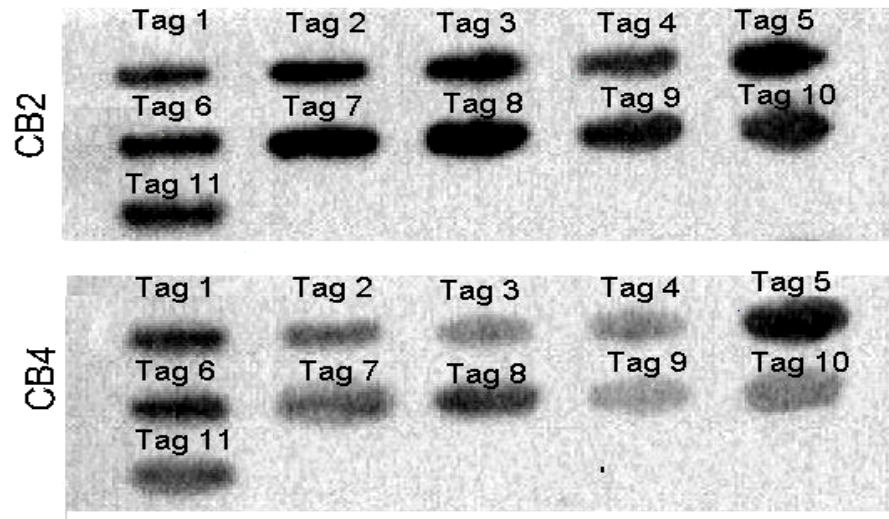


Abb. 33: Expressionsstudie des möglichen RAS-Klones mit aus der Kultur Col. M5 isolierter Gesamt-RNA. Es wurden pro Slot 10 µg RNA aufgetragen. Die Intensität des Signals wurde einem Bioimager ausgewertet. Der Aufbau des Slot Blots ist unter 2.6.1.8.3, die Hybridisierungsprozedur unter 2.6.1.10 beschrieben. Als Sonde diente der homologe Klon RAS-1.1.

Trägt man die Intensität der Signale gegen die Enzymaktivität auf, ist eine deutliche Korrelation der Enzymaktivität mit der RNA-Akkumulation zu erkennen.

Für in CB2-Medium angezogene Zellen ist dies in Abbildung 34 eindeutig zu erkennen. Jeder Anstieg der RNA-Akkumulation erfolgt hier nahezu zeitgleich zu einem Anstieg der Enzymaktivität.

Auch für in CB4-Medium gewachsene Zellen trifft dies zu. Hier verläuft die RNA-Akkumulation ebenfalls weitgehend parallel zur Enzymaktivität der RAS (Abbildung 35). Die höchste RNA-Akkumulation tritt hier am sechsten Tag parallel zum Aktivitätsmaximum der RAS auf. Allerdings verläuft der Anstieg der RNA-Akkumulation etwas steiler und bleibt nach Erreichen des Maximums an Tag sechs noch bis zum achten Tag auf einem Niveau.

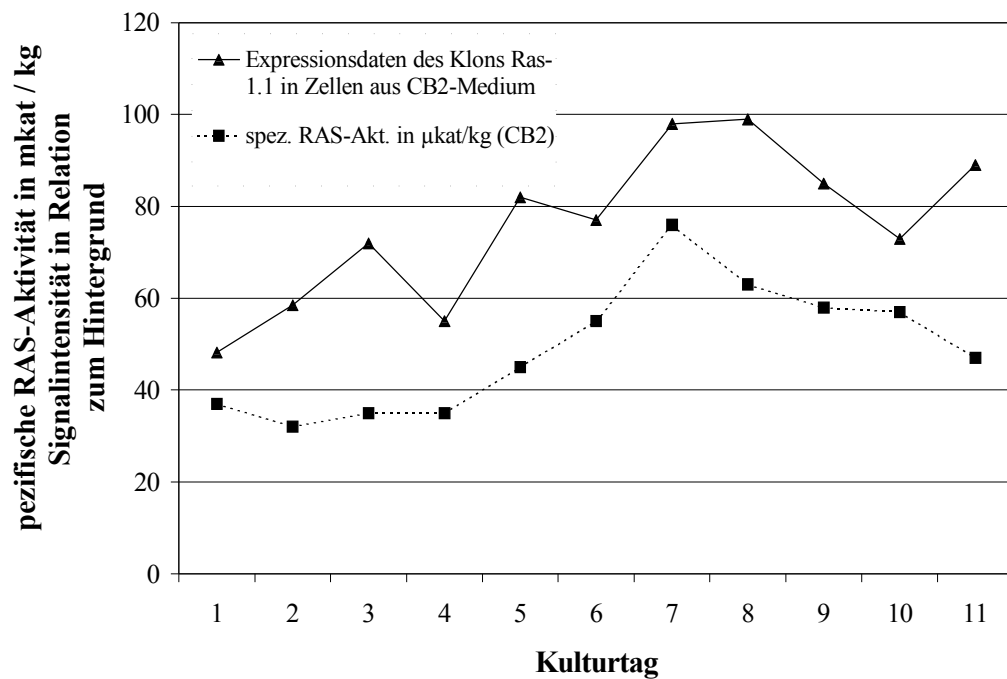


Abb. 34: Vergleich der für den möglichen RAS-Klon erhaltenen Expressionsdaten und der Enzymaktivität der RAS bei in CB2-Medium gewachsenen Zellen der Kultur Col. M5. Die Werte für die RNA-Akkumulation wurden aus 6 unterschiedlichen Slot Blots gemittelt. Die hier dargestellten Intensitäten sind relativ zum Hintergrund des Blots angegeben.

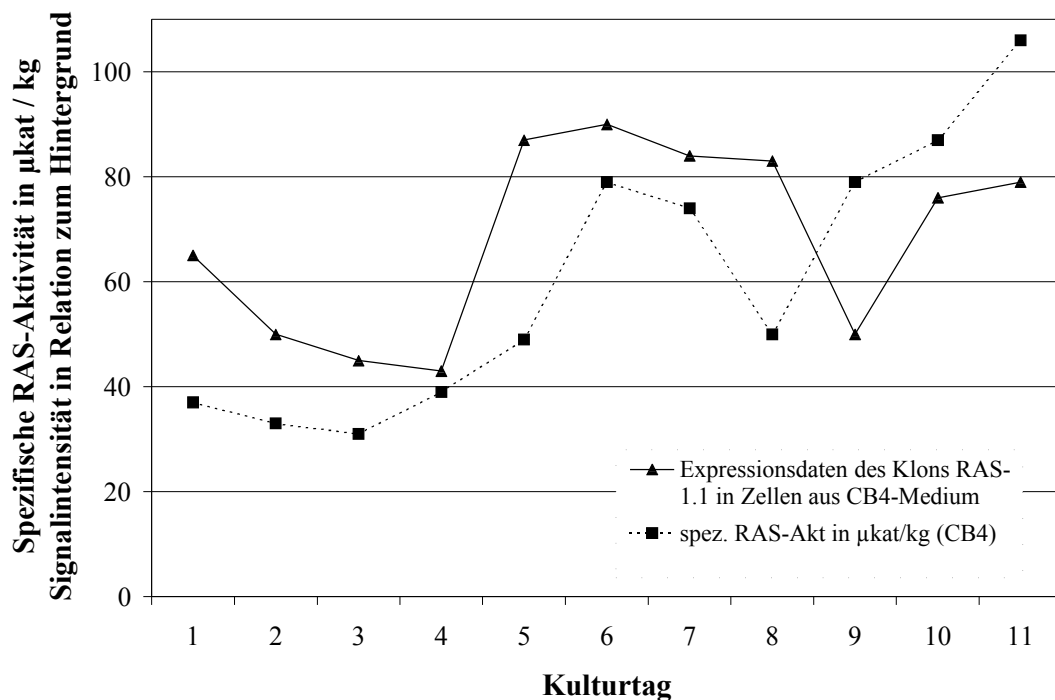


Abb. 35: Vergleich der für den möglichen RAS-Klon erhaltenen Expressionsdaten und der Enzymaktivität der RAS bei in CB4-Medium gewachsenen Zellen der Kultur Col. M5. Die Werte für die RNA-Akkumulation wurden aus 6 unterschiedlichen Slot Blots gemittelt. Die hier dargestellten Intensitäten sind relativ zum Hintergrund des Blots angegeben.

3.5: Proteinreinigung

Insgesamt wurden 2400 g Zellmaterial aus *Coleus blumei* Suspensionskulturen aufgearbeitet, um eine für die Sequenzierung ausreichende Menge an Gesamtaktivität und Protein zu erhalten. Dabei wurde für eine einzelne Aufarbeitung 50 g Zellmaterial verwendet.

Die gesammelten Rohextrakte besaßen einen Gesamtproteingehalt von 39,2 g und eine gemittelte spezifische Aktivität von 6,1 $\mu\text{kat} / \text{kg}$. Auf diese Werte beziehen sich die für die nachfolgenden Reinigungsschritte berechneten Ausbeuten an Enzym sowie der Reinigungsfaktor der nachfolgenden Reinigungsschritte.

3.5.1: Ammoniumsulfatfällung

Aus insgesamt 48 Fällungen (60-80 % Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), wurden 5.9 g Protein zur Weiterverarbeitung gewonnen. Die über alle Fällungen gemittelte Gesamtaktivität der Extrakte betrug zu diesem Zeitpunkt 51.1 mkat. Die spezifische Aktivität betrug 8.7 $\mu\text{kat} / \text{kg}$. Durch die Ammoniumsulfatfällung konnte im Schnitt ein Reinigungsfaktor von 1.4 erreicht werden, die Ausbeute betrug 21.3 %.

3.5.2: Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Fractogel TSK Butyl:

Bei der im Anschluss an die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführten Chromatographie an Fractogel TSK Butyl 650 (M) konnte beobachtet werden, dass bei einer Proteinmenge von ca. 0.3 g die RAS unter Startbedingungen vollständig an das Säulenmaterial band (Abb. 36). Im Verlauf der Chromatographie eluierte die RAS bei einer Konzentration von 0.7 - 0.3 M Ammoniumsulfat in einer recht breiten Zone von der Säule.

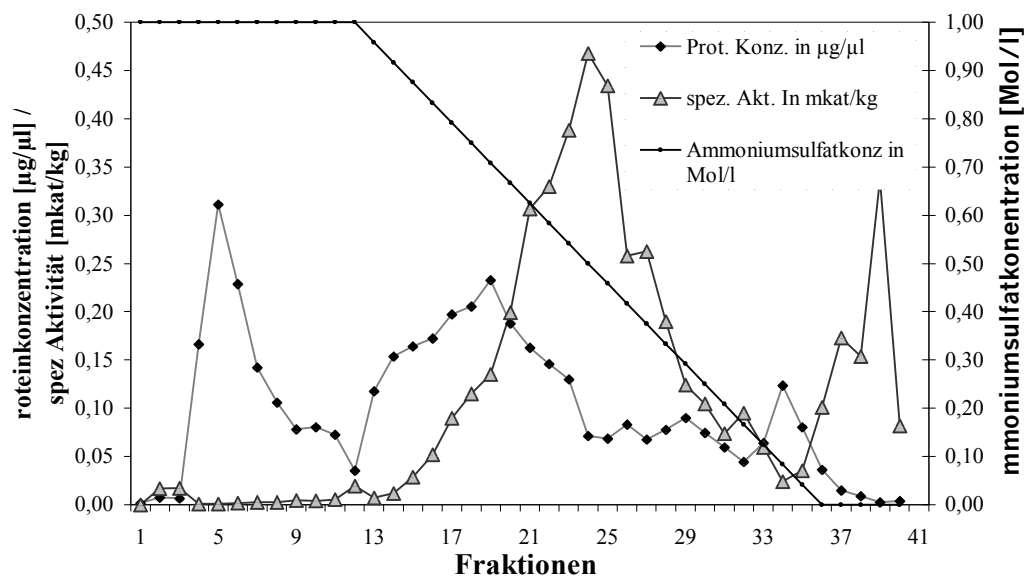


Abb. 36: Elutionsprofil der RAS-Aktivität bei hydrophober Interaktionschromatographie (HIC). Säulenmaterial: Fractogel TSK Butyl 650 (M); Puffer: 10 mM K-Phosphat, pH 7,0, 1 mM DTT mit abnehmender Konzentration an Ammoniumsulfat. Flußrate: 1 ml / min. Fraktionsgröße 2 ml.

Bei der in Abbildung 36 gezeigten Chromatographie wurden die Fraktionen 21–30 weiterverwendet.

Insgesamt wurden 24 Reinigungsläufe durchgeführt. Gemittelt über diese Läufe betrug die Ausbeute an Protein 8.5 %, die spezifische Aktivität lag bei 225.7 $\mu\text{kat} / \text{kg}$. Es konnte ein Reinigungsfaktor von 37 erzielt werden. Bezogen auf das mit Ammoniumsulfat gefällte Protein betrug der Reinigungsfaktor 25.9, die Ausbeute an RAS 40 %.

3.5.3: Affinitätschromatographie an „R-2382 Reactive Yellow 86 Agarose“:

Reinigungsversuche mit Säulen mit dem Trägermaterial "R-2382 reactive Yellow-Agarose" (siehe Abb. 37) wurden ursprünglich aufgrund der beschriebenen Affinität des Materials zu CoA-abhängigen Enzymen (Hohlfeld et al. 1995, 1996; Yu und Facchini 1999) in die Reinigung der RAS einbezogen.

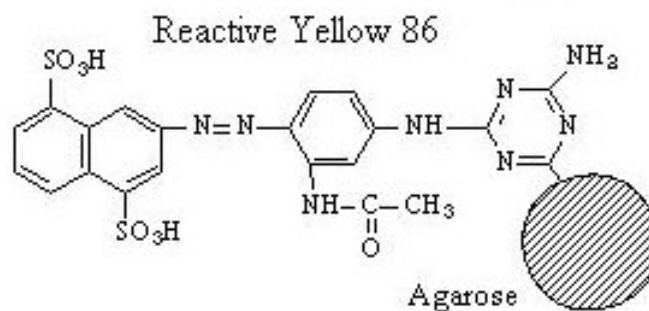


Abb. 37: Aufbau von "reactiveYellow 86"-Agarose. Aus dem von Sigma mitgelieferten Datenblatt

Eine Bindung der RAS an das Säulenmaterial trat allerdings nicht ein, und die Aktivität konnte vollständig in den Waschfraktionen gefunden werden. Auch durch eine Inkubation des Säulenmaterials mit dem Protein über Nacht bei 4 °C oder Variationen in der Salzkonzentration der aufgetragenen Proteinfraction konnte keine Bindung erreicht werden.

Trotzdem wurde die Chromatographie an Yellow-Agarose weiterhin für die Reinigung der RAS verwendet, da die Hauptaktivität zwar bereits beim Waschen, aber kurz nach der Elution der Hauptmenge an Protein erfolgte. Somit konnte ein deutlicher Reinigungseffekt erzielt werden. In Abbildung 38 ist das Elutionsprofil der RAS-Aktivität an Yellow-Agarose dargestellt.

Die Untersuchungen des Einflusses unterschiedlicher Salzkonzentrationen in der Probe ergaben, dass es nicht nötig war, die durch die HIC oder die Chromatographie an TSK AF-Blue mit Ammoniumsulfat oder KCl angereicherten Proteinfractionen beim Konzentrieren zu entsalzen. Dies war ein wichtiger Punkt in der Erwägung, die Chromatographie an Yellow-Agarose direkt nach der HIC und vor der Chromatographie an AF-Blue durchzuführen. Auf diese Weise mussten die Fraktionen der HIC, die RAS-Aktivität enthielten, lediglich aufkonzentriert und nicht entsalzt werden und lagen darüber hinaus nach der Chromatographie an Yellow-Agarose direkt im richtigen Puffer für die Chromatographie an AF-Blue vor.

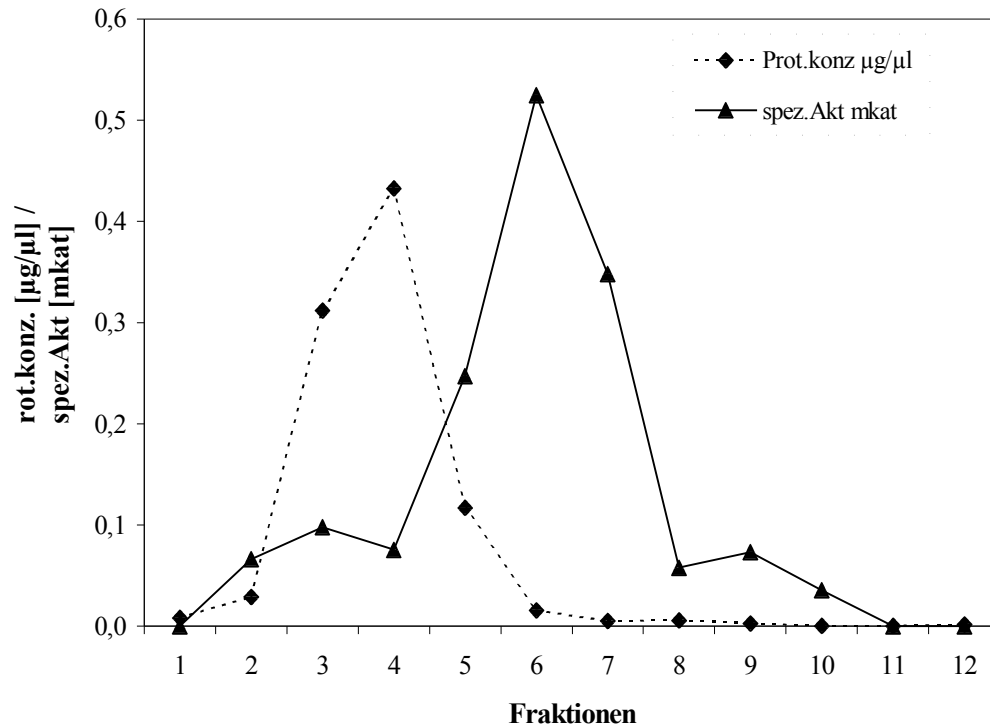


Abb. 38: Elutionsprofil der RAS-Aktivität an Yellow Agarose. Puffer: 10 mM KPi, 1 mM DTT, pH 7.0. Die Elution erfolgte beim Waschen, Flußrate 0,5 ml/ min, Fraktionsgröße 1,5 ml.

Aus der in Abbildung 37 dargestellten Chromatographie wurden die Fraktionen 5-8 weiterverwendet. Mit aufkonzentrierten Extrakten aus der HIC wurden insgesamt 6 Läufe durchgeführt. Dies entsprach einer Gesamtproteinmenge von ca. 15 mg pro Lauf. Bei dieser Menge an Gesamtprotein war es noch möglich, die RAS-Aktivität enthaltenden Fraktionen gut vom Hauptproteinpeak zu trennen. Die gemittelte Ausbeute an Protein aus diesen Läufen betrug 0.1 % und die gemittelte spezifische Aktivität lag bei 340.5 µkat / kg. Durch diesen Schritt konnte ein Reinigungsfaktor von 55.8 erzielt werden. Bezogen auf die HIC ergab sich eine Ausbeute von 1.1 % und ein Reinigungsfaktor von 1.5. Die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten wurden zusammengefasst, aufkonzentriert und für einen Lauf an Fractogel TSK AF-Blue verwendet.

3.5.4: Affinitätschromatographie an Fractogel TSK AF-Blue:

Bei der Chromatographie an TSK AF-Blue band die RAS bei einer aufgetragenen Gesamtproteinmenge von ca. 0.35 mg unter Startbedingungen vollständig an das Säulenmaterial. Im Verlauf der Chromatographie erfolgte die Elution der RAS durch einen ansteigenden KCl-Gradienten (0-1 M) bei einer KCl-Konzentration von 0.3 bis 0.8 M. In Abbildung 39 ist der Verlauf einer solchen Chromatographie dargestellt.

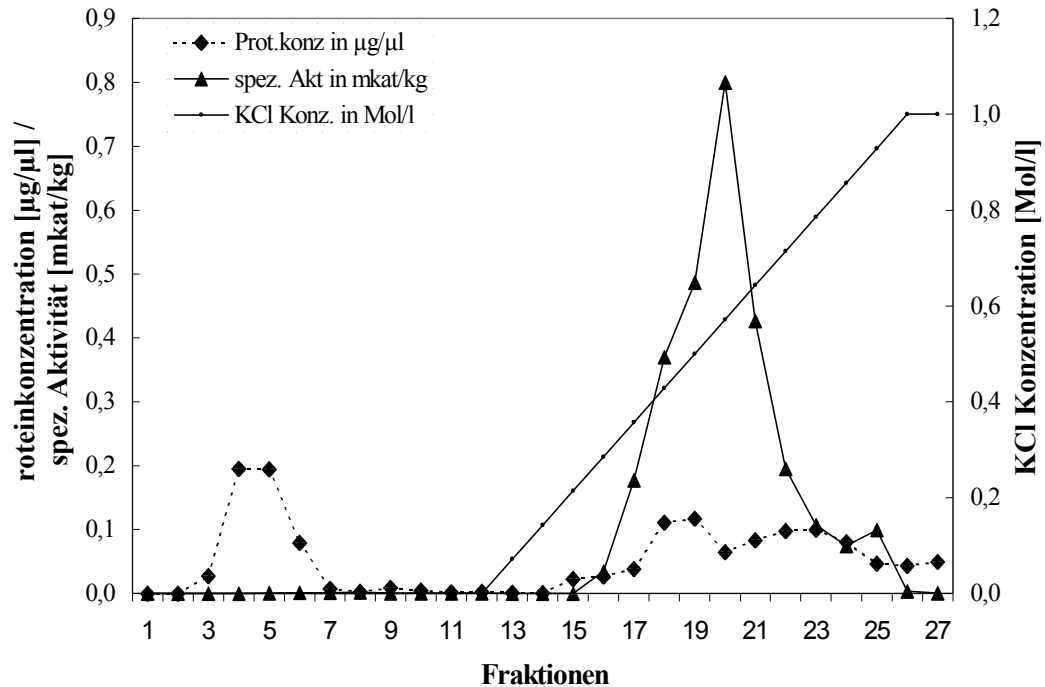


Abb. 39: Elutionsprofil der RAS-Aktivität von Fractogel TSK AF Blue. Puffer: 10 mM KPi, 1 mM DTT, pH 7.0. Die Elution erfolgte durch einen ansteigenden KCl-Gradienten., Flußrate 1 ml / min, Fraktionsgröße 2 ml.

Bei dem hier gezeigten Reinigungslauf wurden die Fraktionen 17–22 weiterverwendet. Durch diesen Reinigungsschritt war es möglich, einen Reinigungsfaktor von 119.34 und eine spezifische Aktivität von 728 $\mu\text{kat} / \text{kg}$ zu erreichen. Die Ausbeute betrug zu diesem Zeitpunkt noch 0.003 %. Bezogen auf den vorangegangenen Reinigungsschritt an Yellow-Agarose betrug die Ausbeute 3 % und es konnte ein Reinigungsfaktor von 2.1 erzielt werden.

Die Erfolge der einzelnen Reinigungsschritte wurden jeweils an Hand von Enzymtests sowie mit denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließender Silberfärbung kontrolliert.

Abbildung 40 zeigt eine SDS-PAGE nach Silberfärbung, die den Reinigungsverlauf bis zur nativen Gelelektrophorese dokumentiert. Die Chromatographie an Yellow-Agarose wurde zu diesem Zeitpunkt nach der Chromatographie an TSK AF-Blue durchgeführt.

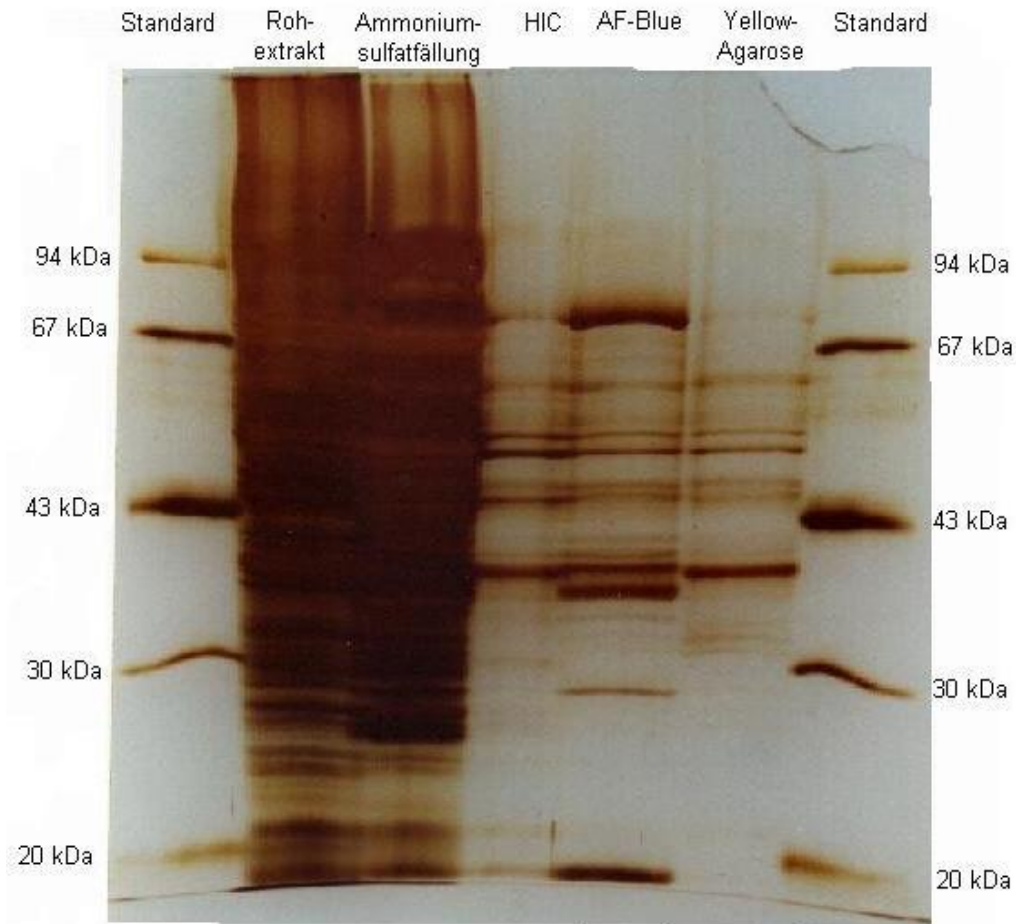


Abb. 40: SDS-PAGE (10 % Acrylamid im Trenngel) von Proteinfractionen im Verlauf der Reinigung der RAS. Vom Rohextrakt wurden 70 µg Protein (35 µl) aufgetragen, von dem über Ammoniumsulfatfällung gereinigten Protein ebenfalls 70 µg (8 µl), von den anderen Extrakten jeweils 7 µg Protein. Das Volumen der Fraktionen betrug vor der Fällung mit TCA bei der über HIC gereinigten Proteinfraction 8 µl, bei der über AF-Blue gereinigten Fraction 300 µl, und bei dem über Yellow-Agarose gereinigten Protein 18 µl.

Es ist hier gut zu sehen, dass der zusätzliche Schritt, die Affinitätschromatographie an Yellow 86 Agarose, zu einem deutlichen Reinigungserfolg führt.

In Tabelle 14 sind Reinigungsfaktor sowie Ausbeute bezogen auf den Rohextrakt aufgetragen.

Zusammengefasst ergab sich also bis zur nativen Gelelektrophorese ein Reinigungsfaktor von 119.34 mit einer Ausbeute von 0.003 %.

	Roh-extrakt	Ammonium-sulfatfällung	HIC	Yellow-Agarose	AF-Blue	natives Gel
Gesamtprotein in mg	39200	5904	90.7	0.7	0.01	Parameter nicht bestimmbar. RAS in der Proteinbande homogen rein
Reinigungsfaktor (-fach)	1	1.4	37	55.8	119.34	
Ausbeute in %	100	21.3	8.5	0.1	0.003	
Aktivität in μ kat	240210	51131.5	20470.9	245.2	7.3	
spez. Aktivität in μ kat / kg	6.1	8.7	225.7	340.5	728	

Tab. 14: Reinigungsdaten für die Rosmarinsäuresynthese aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei*

3.5.5: Native Gelelektrophorese

Für die im Anschluss folgende native Gelelektrophorese wurden die Enzymextrakte verwendet, die alle Reinigungsschritte durchlaufen hatten. Das Protein wurde auf ca. 1 ml aufkonzentriert und dann in mehreren Spuren auf ein natives Gel aufgetragen. Zur Kontrolle des Laufes wurde, wie in 2.8.1.4.4 beschrieben, je ein Streifen abgeschnitten und gefärbt. Das restliche Gel wurde in ca. 1 cm große Stücke geschnitten und einzeln in Eppendorfgefäße gegeben, die den entsprechenden Reaktionspuffer enthielten, eluiert und auf RAS-Aktivität getestet.

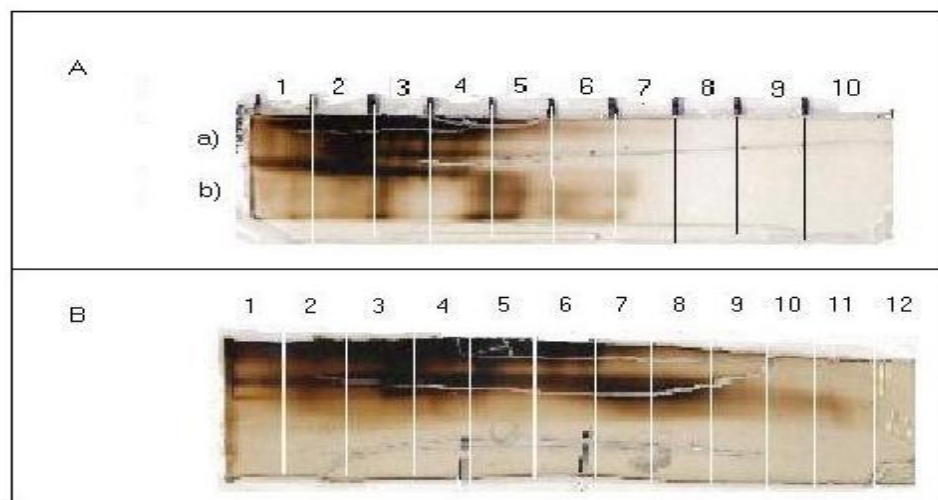


Abb. 41: Nachträglich zur Kontrolle gefärbte Streifen der nativen PAGE. Die Laufrichtung des Gels geht hier von links nach rechts. Unter A in Spur a) sieht man die aufgetragene Proteinfraktion, in Spur b) den Molekulargewichts-Standard. Unter B wurde kein Molekulargewichts-Standard mit gefärbt, hier sieht man lediglich die aufgetragene Proteinfraktion. In beiden Gelen markieren die weißen und schwarzen Linien die Stellen an denen das Gel für die Elution zerschnitten wurde.

Insgesamt wurden zwei native Gelelektrophoresen (Abb. 41 A und B) durchgeführt. Der Enzymtest zeigte, dass sich bei Gel 1 (Abb. 41 A) die größte Aktivität in den Streifen 4 und 5 befand. Im zweiten nativen Gel (Abb. 41 B) befand sich die Hauptaktivität in den Streifen 5 und 6.

Die Eluate aus den Gelstücken wurden einer denaturierenden Gelelektrophorese unterzogen, um feststellen zu können, inwieweit die RAS bereits aufgereinigt vorlag und welche Bande mit der RAS korrespondierte.

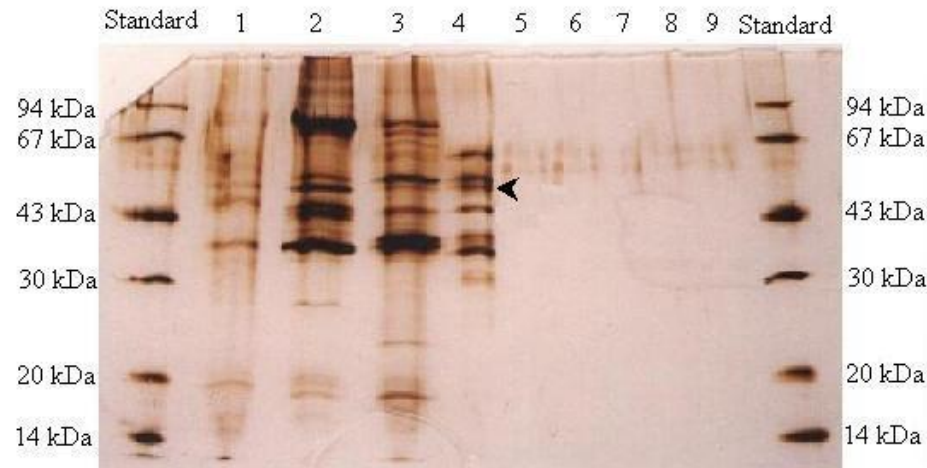


Abb. 42: SDS-PAGE der nach der nativen PAGE (Abb. 33 A) aus dem Gel eluierten Fraktionen. Die Zahlen 1–9 bezeichnen die jeweils aufgetragene Proteinfraktion. Die mit Standard bezeichneten Bahnen enthalten den Molekulargewichtsstandard.

Die höchste Aktivität und somit die deutlichste Bande müßte sich also in den Fraktionen 4 und 5 befinden. Der Pfeil in Abbildung 42 bezeichnet die Bande, bei der es sich um die RAS handeln könnte. Allerdings befindet sich in der Fraktion 5 insgesamt zu wenig Protein, um dies mit Sicherheit sagen zu können.

Die Fraktionen des zweiten nativen Gels wurden vereinigt und zunächst lediglich mit Coomassie Blue angefärbt, um eine nachfolgende Sequenzierung noch möglich zu machen.

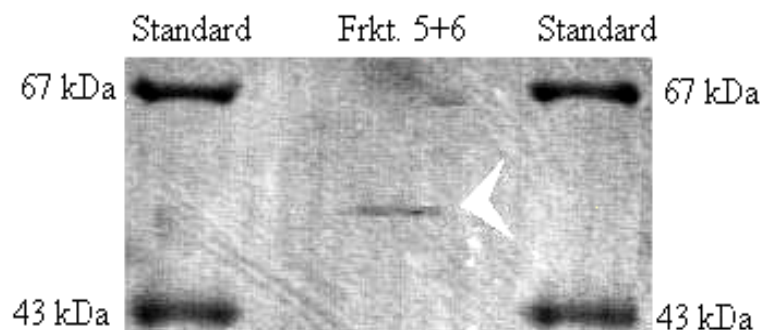


Abb. 43: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der aus der nativen PAGE (Abb. 33 B) eluierten und vereinigten Fraktionen 5 und 6. Rechts und links von der mit weißem Pfeil gekennzeichneten Bande ist ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen.

Abb.43 zeigt einen Ausschnitt dieses Gels. Die nach diesem Gel bestimmte Größe der RAS betrug 53 kDa. Dies entspricht den Arbeiten von Juliane Meinhard (1995).

Die Proteinbande wurde ausgeschnitten und aus dem Gelstücke wie unter 2.6.2.4 beschrieben sequenziert.

Das in Abbildung 43 dargestellte Gel wurde, nachdem die Proteinbande ausgeschnitten war, noch einmal zur Kontrolle einer Silberfärbung unterzogen. Das Ergebnis dieser Färbung ist in Abbildung 44 dargestellt und zeigt, dass die RAS weitgehend rein vorlag und sich keine weiteren Banden an der Stelle der ausgeschnittenen Bande befanden. Auch ist zu sehen, dass in den Fraktionen 7 und 4 keine Proteine dieser Masse vorhanden waren.

Dies lässt den Schluß zu, dass die Bande der RAS zuzuordnen sein könnte und dass es sich bei dieser Bande um ein einziges Protein handelt.

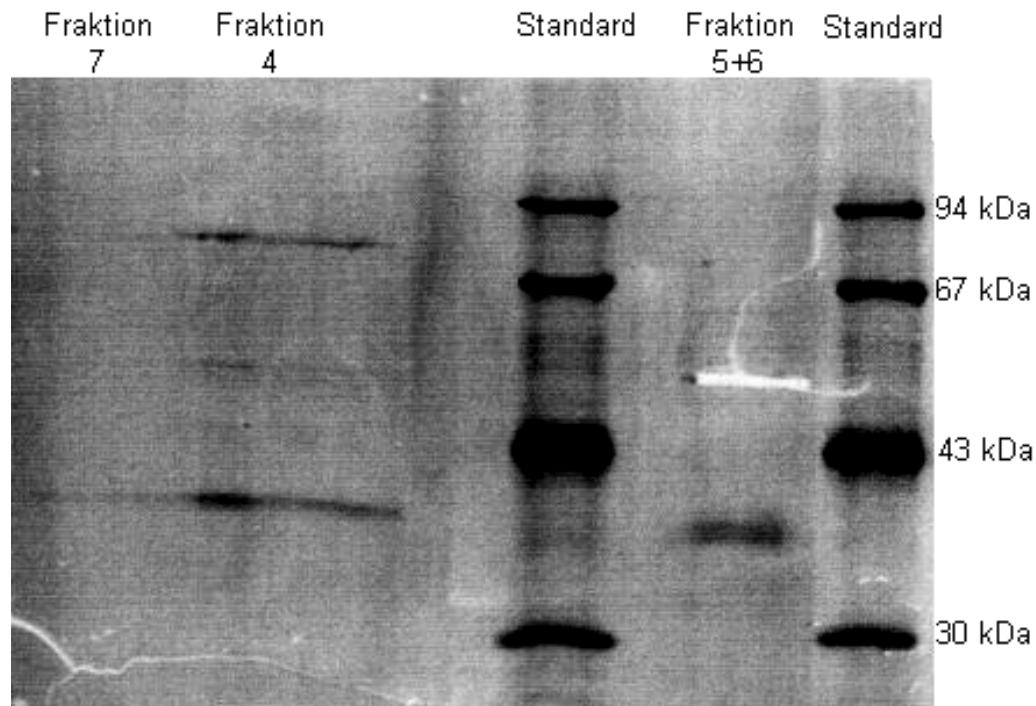


Abb. 44: Mit Silber nachgefärbte SDS-PAGE (siehe Abb. 43). Die in der Coomassie Färbung sichtbare Bande ist hier zum Zweck der Proteinsequenzierung bereits ausgeschnitten. Die Spuren die mit „Fraktion 7“ und mit „Fraktion 4“ bezeichnet sind enthalten die Geleluate der entsprechenden Fraktionen die zur Kontrolle mit aufgetragen wurden.

Aufgrund der Intensität der Bande im nach Coomassie gefärbten Gel (Abb.43) wurde die Menge an vorhandenem Protein auf ca. 8 µg geschätzt.

3.6.: Proteinsequenzierung:

Die Analyse des gereinigten Proteins über MALDI-TOF (2.6.2.4.3) an der Universität in Zürich bestätigte, dass tatsächlich nur ein Protein in der Bande vorlag. Vergleiche der so ermittelten Aminosäurezusammensetzung mit bereits bekannten Proteinen über EMBL- Swissprot- und SRS-Datenbanksuche ergaben keine Übereinstimmungen.

Über die anschließende Mikrosequenzierung des Proteins mittels Nano-ES (2.6.2.4.4) konnten die in Tabelle 15 aufgeführten Sequenzen ermittelt werden:

Proteinsequenz	Daraus abgeleitete DNA Sequenz
D F (L/I) E (L/I) Q E D (L/I) S K	AAYTTYHTNCARHTNGARCARAAYHTNWSNA AR
A (L/I) V E F Y P S F G R	GCNHTNGTNCARTTYTAYCCNWSNTTYGGNM GN
(L/I) D E D Y (L/I) R	HTNAAycARAAyTAYHTNMGN
(Q/K) P A P T P (L/I)	RARCCNGCNCCNACNCCNHTN
S Y (L/I) (L/I) P	WSNTAYHTNHTNCCN
Y F G	TAYTTYGGN

Tab. 15: Aus der Sequenzierung des gereinigten Proteins erhaltene Sequenzen mit daraus abgeleiteter DNA Sequenz N=A,C,G,T; B=C,G,T; D=A,G,T; H=A,C,T; V=A,C,G; K = G,T; M = A,C; R= A,G S=C,G; W=A,T; Y=C,T; I= Inosin

Aus diesen Sequenzen wurden wie in 2.10.2 und 2.10.3.1 beschrieben Sonden hergestellt, die dann zur Durchsichtung von cDNA-Banken und für die PCR verwendet wurden

3.7: Klonierung der PAL

Beim Durchsuchen der Lambda gt10cDNA-Bank mit dem heterologen Klon pAL-23 (Joos und Hahlbrock 1993) konnten bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C 16 mögliche Klone identifiziert werden. Diese wurden in pKS⁻ umklont und mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten. Anhand dieser Schnittstellenanalyse konnten zwei Gruppen von Klonen (siehe Abbildung 45) gebildet werden, die sich durch das Fehlen oder Vorhandensein einer BamHI Schnittstelle unterscheiden.

Zur ersten Gruppe gehörten PAL-1, 6, 7, 10, 11, 14, 15 und 16 wobei PAL-1 mit 1,2 kb der längste Klon dieser Gruppe war und deswegen zur Sequenzierung ausgewählt wurde. Für diesen Klon ergab der Vergleich, der nach Sequenzierung durch den von Eurogentech angebotenen "run-service" in den Gendatenbanken Blast und EMBL durchgeführt wurde, eine deutliche Übereinstimmung mit PAL-Genen anderer Pflanzen darunter *Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Petroselinum crispum*, *Lycopersicon esculentum* und *Phaseolus vulgaris*.

Zur zweiten Gruppe gehörten PAL-2, 3, 5, 8, 9, 12 und 13. Hier wurde PAL-2, mit PAL-8 und PAL-13 der längste Klon der Gruppe (1 kb), für die Sequenzierung weiterverwendet. Auch hier ergab sich nach der Sequenzierung im Vergleich mit DNA-Sequenzen der PAL anderer Pflanzen eine deutliche Übereinstimmung.

Der Klon PAL-4, der zu keiner der beiden Gruppen gezählt werden konnte, erwies sich nach Sequenzierung und anschließendem Vergleich der Sequenz in Datenbanken von EMBL nicht als PAL-spezifisch.

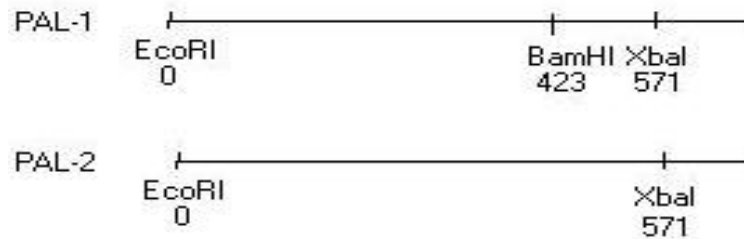


Abb. 45: Schnittstellen bei PAL-1 und PAL-2. Die bei den Klonen PAL-1, 6, 7, 10, 11, 14, 15 und 16 bei 423 bp vorhandene BamHI Schnittstelle existiert bei den Klonen PAL-2, 3, 5, 8, 9, 12 und 13 nicht.

Da die Klone PAL-1 und 2 identische Hybridisierungsmuster beim Durchsuchen der cDNA-Bank selbst dann ergaben, wenn die Hybridisierungstemperatur auf 68 °C erhöht wurde, wurde ein Fragment des Klons PAL-1 wie in 2.9 beschrieben für die weitere Suche verwendet.

Mit dem PAL-1 Fragment konnten sechs weitere Klone, PAL-17 bis 22, gefunden werden, die mit PAL-1 identisch waren. Lediglich der Klon PAL-22 wich von seiner Struktur her deutlich von den anderen ab. Das Restriktionsmuster der Klone ist in Abbildung 46 gezeigt. PAL-19 wurde als längster Klon für die Sequenzierung ausgewählt. Der Klon PAL-22 wurde wegen seines abweichenden Restriktionsmusters ebenfalls sequenziert.

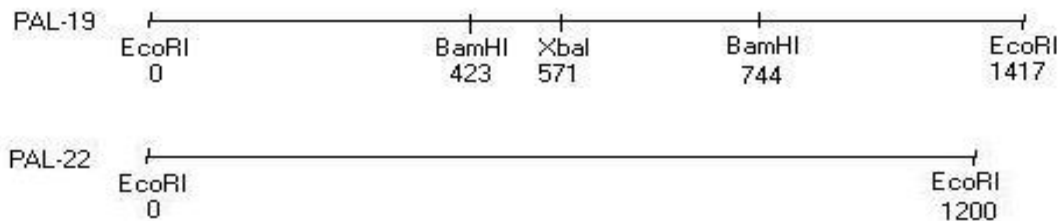


Abb. 46: Restriktionsmuster der Klone PAL-19 und PAL-22. Die Klone PAL-16, 17, 18, 20 und 21 wiesen bei unterschiedlicher Länge ein zu PAL-19 identisches Restriktionsmuster auf. Der Klon PAL-22 ließ sich mit keinem der getesteten Restriktionsenzyme schneiden.

Die Sequenzierung ergab für beide Klone eine deutliche Übereinstimmung mit PAL-Sequenzen anderer Pflanzen, wobei die Homologie des Klons PAL-19 zu heterologen PAL-Klonen höher war als die des Klons PAL-22 (siehe 6.1.1)

Expressionsstudien für PAL-19 und PAL-22 mit über den Verlauf einer Kulturperiode von 11 Tagen isolierter RNA (3.4.1) ergaben allerdings identische Ergebnisse, weshalb im weiteren der Klon PAL-19 für diese Experimente verwendet wurde.



Ein Northern Blot mit PAL-19 als Sonde ergab eine einzelne Bande mit einer Größe von ca. 2 kb (Abbildung 47)

Abb. 47: Northern Blot mit PAL-19 als Sonde. Die aufgetragene RNA-Menge betrug 5 µg PolyA⁺-RNA. Die Elektrophorese wurde wie unter 2.6.1.5.2, das Blotting wie unter 2.6.1.8.2 beschrieben durchgeführt. Hybridisierung und Detektion erfolgten wie unter 2.6.1.10 und 2.6.1.11 angegeben.

Die Sequenzen der unterschiedlichen PAL-Klone sind unter 6.1.1 aufgeführt. Dort werden auch die Homologien mit anderen PAL-Klonen dargestellt. Die Übereinstimmung mit PAL-Klonen anderer Pflanzen lag zwischen 90 und 70 %.

3.8: Klonierung der RAS

3.8.1: Suche in cDNA-Banken

Beim Durchsuchen der Lambda gt 10 cDNA-Bank mit den Sonden MP-6 und MP-10 (2.10.2) konnten Hybridisierungssignale erst bei einer Hybridisierungstemperatur von 37 °C erzielt werden. Unter diesen Bedingungen wurden 5 Klone isoliert, von denen sich drei bei der anschließenden Sequenzierung als bereits bekannte Sequenzen erwiesen. Die Übereinstimmungen lagen hier zwischen 80 und 90 % für RAS-1 bei einem Gen für Preproendothelin (emb/X75593/HSRAB13), für RAS 2 bei einem Gen für eine Metalloendopeptidase (MEP) (gb/M97179/SCOMEPAY1) und für RAS-3 bei einem Gen für RNA-Polymerase des Hepatitis C Virus (gb/U14284/HCU14284). Lediglich für die Sequenzen der Klone RAS-4 und RAS-5 konnten keine Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen in den Blast und EMBL Datenbanken gefunden werden.

Ein zur Verifizierung dieser möglichen RAS-Klone durchgeführter Southern Blot mit genomischer DNA aus der *Coleus*-Kultur Col. 20 und aus verschiedenen anderen Pflanzen, die Rosmarinsäure synthetisieren, sowie zwei Negativ-Kontrollen, zeigte allerdings kein Hybridisierungsergebnis bei Hybridisierungstemperaturen zwischen 60 und 45 °C. Ein Northern Blot mit Gesamt- sowie PolyA⁺-RNA mit Mengen zwischen 5 und 15 µg PolyA⁺- und 10 bis 30 µg Gesamt-RNA, ergab ebenfalls kein Hybridisierungsergebnis. Auch in Slotblots mit an verschiedenen Kulturtagen isolierter Gesamt-RNA der Kultur Col. 20 konnte keine Hybridisierung erreicht werden. Aus diesen Gründen wurde mit den Klonen RAS-4 und RAS-5 nicht weitergearbeitet.

Ein Durchsuchen der Lambda gt10 cDNA-Bank, mit den aus der erneuten Reinigung und anschließender Sequenzierung (siehe 3.6) abgeleiteten Sonden RAS-AB-1 und -2 (siehe 2.10.2), ergab bei Hybridisierungstemperaturen zwischen 50 und 40 °C keine Ergebnisse. Auch in der neu erstellten cDNA-Bank (siehe 2.10.1) konnte kein Ergebnis erzielt werden.

3.8.2: Klonierung über PCR

Bei der PCR mit verschiedenen Primern (siehe 2.10.3.1) war es möglich, mit der Primerkombination RAS-1-F und RAS-2-R an genomischer DNA aus *Coleus* zwei Amplifikate der Größe 2,1 und 1,2 kb zu erhalten. Bei genomischer DNA aus *Blechnum brasiliense* konnte mit derselben Primerkombination ein amplifiziertes Fragment mit einer Größe von 1,5 kb erhalten werden. Diese Fragmente erwiesen sich allerdings nach der Sequenzierung als bereits bekannte DNA-Sequenzen. Hier lagen die Übereinstimmungen mit 90 und 96 % bei den Chloroplasten-Importproteinen Tic 20 und Tic 22 für die aus *Coleus* amplifizierten Fragmente und für das aus *Blechnum* amplifizierte Fragment mit 89 % ebenfalls bei Tic 20. Mit der Primerkombination RAS-1-R und λ gt10-R war es möglich, mit aus der cDNA-Bank isolierter DNA, ein Amplifikat von 0,9 kb zu erhalten. Auch hier handelte es sich aber um eine bereits bekannte Sequenz aus einem Plasmid von *E-coli*. Weitere Versuche wurden aufgrund der unspezifischen Ergebnisse nicht mehr durchgeführt.

3.8.3: RT-PCR

Bei der RT-PCR mit unterschiedlichen Primerkombinationen (siehe 2.10.3.2) konnten Ergebnisse mit RAS-AB4 und oligo-dT(15), RAS-1-R und RAS-2-F, sowie mit der Kombination RAS-2-F und oligo-dT(15) erzielt werden. Die Größe, der durch die PCR mit RAS-AB4 und oligo-dT(15) erzielten Bande, betrug 1 kb (Abb. 48), bei der PCR mit RAS-1-R und RAS-2-F ergaben sich drei Banden mit den Größen 2 kb, 1,3 kb und 0,8 kb, bei der PCR mit RAS-2-F und oligo-dT(15) trat die kleinste Bande ebenfalls auf. Während die 0,8 kb-Bande auch bei Annealing-Temperaturen von 65 °C noch amplifiziert wurde, verschwanden die beiden größeren Banden bereits bei einer Annealing-Temperatur von 48 °C (Abb. 49). Die Annealing-Temperatur für die Primerkombination RAS-AB4 und oligo-dT(15) betrug 55 °C.

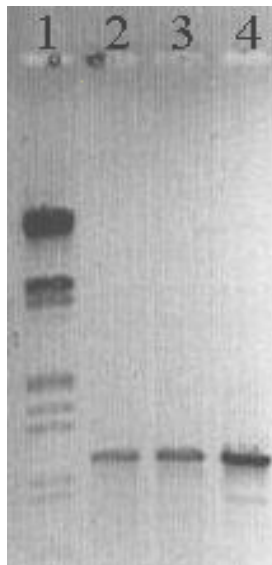


Abb. 48: Das mit der Primerkombination RAS-AB4 / oligo-dT(15) erzielte Amplifikat.

Spur 1: Längenstandard λ -DNA EcoRI, HindIII verdaut,

Spur 2: PCR-Produkt: Annealing bei 45 °C,

Spur 3: PCR-Produkt Annealing bei 55 °C,

Spur 4: PCR-Produkt Annealing bei 55 °C mit Q-Solution im Puffer.

Die Zyklen-Parameter sind unter 2.10.3.2. aufgeführt.

PCR-Bedingungen: Die Mg^{2+} Endkonzentration betrug 1.5 mM, die Primerkonzentration 1 μ M. Es wurde 1 μ g cDNA als Matritze eingesetzt. Die PCR wurde mit HotStar™-Taq durchgeführt. Die Q-Solution im Ansatz 4 war 1x konzentriert.

Von den je 50 μ l umfassenden Reaktionsansätzen wurden 20 μ l für dieses Gel verwendet.

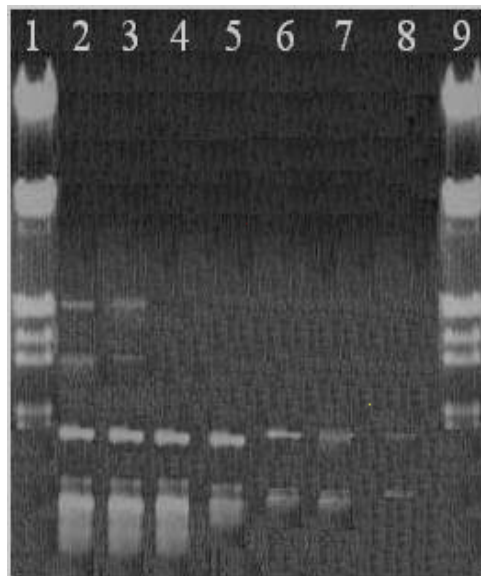


Abb. 49: Die mit der Primerkombination RAS-1-R / RAS-2-F erzielten Amplifikate.

Spur 1+9: Längenstandard λ -DNA EcoRI, HindIII verdaut.

Spur 2-8: PCR-Produkte bei steigender Annealing-Temperatur beginnend bei 45 (2), 47 (3), 49 (4), 51 (5), 55 (6), 60 (7) und 65 °C (8).

Die Zyklen-Parameter sind unter 2.10.3.2. aufgeführt.

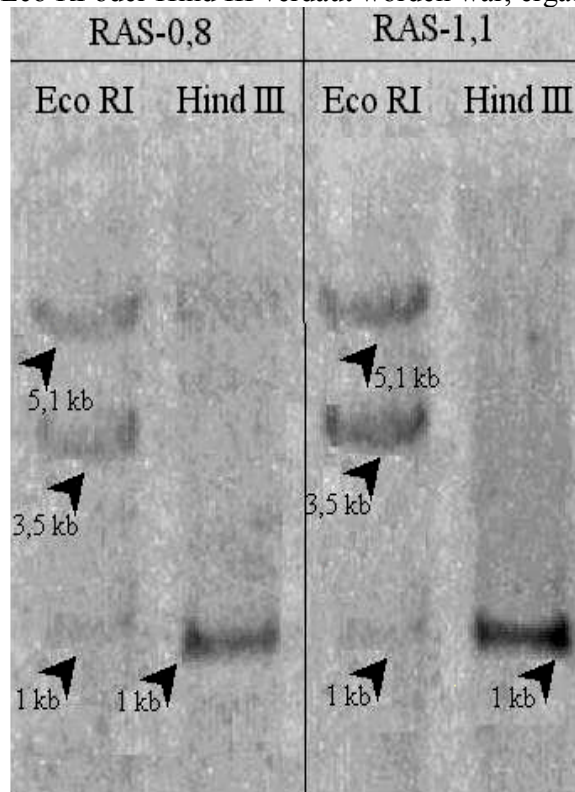
PCR-Bedingungen: Die Mg^{2+} Endkonzentration betrug 1.5 mM, die Primerkonzentration 0.2 μ M. Es wurde 1 μ g cDNA als Matritze eingesetzt. Die PCR wurde mit HotStar™-Taq durchgeführt. Von den je 50 μ l umfassenden Reaktionsansätzen wurden 45 μ l für dieses Gel verwendet.

Die auf diese Weise erhaltenen Amplifikate wurden, wie in 2.6.1.7.2 beschrieben, in den Vektor pGEM®-T kloniert. Nach der Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen mit diesen Konstrukten und anschließender Plasmidisolierung (siehe 2.6.3.4 und 2.6.1.3) wurden die Amplifikate sequenziert. Hierbei zeigten die 2 kb und 1,3 kb

umfassenden Fragmente im Vergleich deutliche Homologien zu den Chloroplastenimport Proteinen TIC 20 und 22. Das mit RAS-1-R / RAS-2-F bzw. mit RAS-2-F / oligo-dT(15) amplifizierte 0,8 kb Fragment, sowie das mit RAS-AB4 / oligo-dT(15) amplifizierte 1,1 kb große Fragment, zeigten ausschließlich geringe Homologien mit in der Funktion unbekannt Sequenzen aus Genomprojekten. Die Sequenzen der beiden Klone waren weitgehend identisch, weshalb vorrangig mit dem größeren der beiden Klone (RAS-1.1) weitergearbeitet wurde. Dieser Klon wurde auch bei den Expressionsstudien (siehe 3.4.2) verwendet.

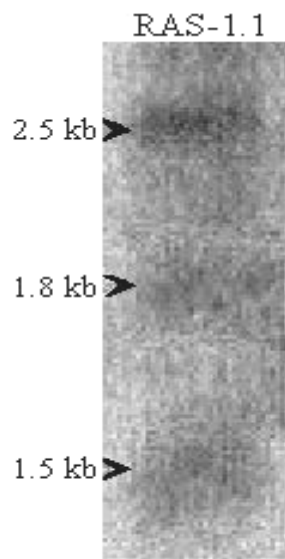
3.8.4: Southern- und Northern-Blotting

In einem Southern Blot mit genomischer DNA aus *Coleus blumei* (Abb. 50), die mit Eco RI oder Hind III verdaut worden war, ergaben sich identische Muster der beiden



Klone. Bei der mit Eco RI-verdauten DNA konnten je zwei deutliche Banden bei einer Größe von 5,1 und 3,5 kb und eine sehr schwache Bande bei einer Größe von 1 kb detektiert werden. Bei der mit Hind III verdauten DNA trat eine einzelne Bande bei 1 kb auf.

Abb. 50: Genomischer Southern Blot mit den über RT-PCR erhaltenen Amplifikaten RAS-0.8 und RAS-1.1. Die Größe der Banden wurde mit Hilfe von durch Eco RI und Hind III geschnittener λ -DNA bestimmt. Es wurden pro Spur 20 μ g entsprechend geschnittene genomische DNA aufgetragen. Die Blotting-prozedur wurde wie unter 2.6.1.8.1 beschrieben durchgeführt. Die Hybridisierung und Detektion erfolgten wie unter 2.6.1.10.1 und 2.6.1.11 beschrieben.



Bei einem Northern Blot mit PolyA⁺-RNA aus der Suspensionskultur Col. M5 (Abb. 51) konnten mit der Sonde RAS-1.1 drei Banden beobachtet werden. Die deutlichste Bande lag hier bei 2,5 kb, während die mittlere Bande eine Größe von 1,8 kb und die kleinste eine Länge von 1,5 kb aufwies.

Abb. 51: Northern Blot mit RAS-1.1 als Sonde. Die aufgetragene RNA-Menge betrug 5 μ g PolyA⁺-RNA. Die Elektrophorese wurde wie unter 2.6.1.5.2, die Blotting-prozedur wie unter 2.6.1.8.2 beschrieben, durchgeführt. Hybridisierung und Detektion erfolgten wie unter 2.6.1.10 und 2.6.1.11 angegeben.

3.8.5: 3'-und 5'-RACE-PCR

Mit dem genspezifischen Primer RAS-1.1-GSP1-F und dem mitgelieferten unspezifischen Primer konnten in der 3'-RACE- sowie in der 5'-RACE-Reaktion ein Fragment von je 1.5 kb erzielt werden. Bei der anschließenden Sequenzierung erwiesen sich diese beiden Amplifikate als nicht mit der Sequenz des RAS-1.1-Klones homolog. Lediglich die Sequenz des verwendeten genspezifischen Primers GSP-1-F konnte bei der in 3'-Richtung durchgeführten Reaktion im Amplifikat wiedergefunden werden. Eine anschließend durchgeführte Reaktion mit den Primern RAS-1.1-GSP2-F und -R unter den gleichen Bedingungen, führte mit dem Primer GSP2-F zu drei Banden der Größen 1.0, 0.8 und 0.4 kb. Ein mit diesen Amplifikaten durchgeführter Southern Blot mit RAS-1.1 als Sonde ergab ein Signal auf Höhe des 0.8 kb Fragmentes. Eine anschließende Sequenzierung erzielte aber erneut keine Übereinstimmung mit der Sequenz des RAS-1.1-Klones. Die Sequenz des verwendeten genspezifischen Primers konnte im Amplifikat nicht wiedergefunden werden.

3.8.6: Sequenzierung der RAS-Klone

Vergleiche der DNA-Sequenz für den Klon RAS-1.1 mit in Genbanken gespeicherten Sequenzen, ergaben eine Übereinstimmung von 71 % bezüglich der ersten 260 bp zu einem bisher noch unbekanntem Gen aus *Arabidopsis thaliana* (EM_PL: ATM3E9). Alle weiteren gefundenen Homologien beschränkten sich ebenfalls auf Teile des Klons. Am auffälligsten sind Übereinstimmungen von 58 % mit T4-cDNA aus *Botrytis cinera* (EM_FUN: CNS01C1C) in der Region zwischen 300 und 500 bp, eine Übereinstimmung von 57 % mit mRNA für KED, einem bei mechanischer Verwundung der Blätter aktiv werdenden Gen aus *Nicotiana tabacum* (EM_PL: AB009883), in der Region zwischen 560 und 850 bp, sowie eine Übereinstimmung von 55 % mit dem menschlichen BAC-Klon CTA-332B2 (EM_HUM: AC005094) in derselben Region. Alle anderen für den Klon RAS-1.1 gefundenen Homologien lagen deutlich unter 50%.

Vergleiche der sechs möglichen Proteinsequenzen für den Klon RAS-1.1 mit in Genbanken vorhandenen Proteinen, ergaben lediglich für das erste Leseraster des komplementären Stranges Homologien im Bereich zwischen 40- und 25 % mit verschiedenen Calmodulinen und anderen Ca-bindenden Proteinen. Strukturvorhersagen deuten darauf hin, dass es sich hier um das, für die Ca²⁺-Bindung verantwortliche EF-Hand-Motiv handelt. Weitere Übereinstimmungen mit anderen Proteinen konnten nicht festgestellt werden

3.9: Klonierung der 4CL

3.9.1: Suche in cDNA-Banken

Bei der Suche mit heterologen Klonen (siehe 2.10) in der λ gt10-, sowie der neu angelegten λ -ZAP-cDNA-Bank, konnte kein Ergebnis erzielt werden. Auch durch die Suche mit Konsensussequenzen (siehe 2.10), die aus verschiedenen 4CL-Klonen zusammengestellt wurden, war es nicht möglich, ein spezifisches Hybridisierungssignal zu erhalten.

3.9.2: PCR / RT-PCR

Die mit der PCR nach Ellis (mündliche Mitteilung siehe 2.10) erhaltenen Amplifikate erwiesen sich in einer späteren Sequenzierung nicht als für die 4CL spezifisch. Mit den Primern 4CL-1-F und -R konnte kein Ergebnis erzielt werden. Auch Variationen der PCR-Parameter (2.10) brachten kein Ergebnis. Für die RT-PCR wurden sowohl die von Ellis entworfenen, als auch die selbst erstellten Primer verwendet. Auch hier fand keine Amplifikation statt.

Aus diesem Grund wurden die Versuche, die 4CL ausgehend von heterologen Sonden und Primern zu klonieren, eingestellt.

4: Diskussion

4.1: Charakterisierung der Suspensionskulturen Col. 20, Col. M1 und Col. M5

Ein Vergleich des Kulturverlaufes der in dieser Arbeit untersuchten Suspensionskulturen von *Coleus blumei* zeigt in Bezug auf die Frisch- sowie Trockengewichtsakkumulation weitgehende Übereinstimmungen auch mit anderen untersuchten *Coleus*-Kulturen (Petersen 1993; Kempin 1994; Meinhard 1995). Der für die bisher untersuchten *Coleus*-Kulturen typische Wachstumsverlauf, der ohne einleitende lag-Phase direkt in ein kurzes exponentielles und dann längeres lineares Wachstum übergeht (Petersen 1993), konnte auch für die hier untersuchten Kulturen beobachtet werden. Allerdings war hier die exponentielle Phase weniger ausgeprägt, als bei den von Petersen (1993) oder Gertlowski und Petersen (1993) untersuchten Kulturen. Auch zeigt die Kultur Col. 20 in CB2-Medium nach der linearen Anstiegsphase eine längere stationäre Phase, in der das Frischgewicht der Zellen weitgehend gleich bleibt. Ein solches Verhalten wurde auch für die Kultur Col. 16 bei Meinhard (1995) beschrieben, trat aber bei den von Gertlowski und Petersen (1993) untersuchten Kulturen nicht auf.

In CB4-Medium verhält sich die Frischgewichtsakkumulation aller hier untersuchten Zelllinien gleich. Es erfolgt ein am ersten Kulturtag beginnender Anstieg, der bis zum achten Kulturtag anhält, bis zum zehnten Kulturtag auf einem Niveau bleibt und dann langsam abnimmt. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der von Meinhard (1995) und Petersen (1993) durchgeführten Untersuchungen überein. Die etwas verlangsamte Frischgewichtsakkumulation bei den in CB5 und CB6 angezogenen Kulturen der Zelllinie M1 ist wahrscheinlich auf die erhöhte Osmolarität des Mediums zurückzuführen. Dieser Effekt wurde auch für die von Petersen (1994) untersuchten Kulturen beobachtet.

Die in dieser Arbeit für die Kulturen Col. 20 und M5 untersuchten Mediumsparameter stimmen ebenfalls mit den für andere Kulturen bestimmten Parametern (Gertlowski 1991; Petersen 1993; Gertlowski und Petersen 1993) überein. Der pH-Wert sank zunächst bis zum zweiten Kulturtag auf Werte um 4.5, um dann kontinuierlich anzusteigen, wobei die pH-Werte in CB2-Medium geringfügig höher lagen als in CB4-Medium. Der Zuckergehalt nahm unabhängig von der Menge des eingesetzten Zuckers in gleicher Geschwindigkeit ab und war in CB2-Medium am fünften und in CB4-Medium am achten Kulturtag vollständig verbraucht. Dies entspricht den durch Petersen (1993) gemachten Beobachtungen. Die Leitfähigkeit nahm in beiden Kulturen bis zum siebten Kulturtag hin kontinuierlich ab und stieg dann, mit dem Einsetzen der Absterbephase zum neunten Kulturtag in CB2-Medium leicht an. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Freisetzung von Phosphat und anderen Salzen durch absterbende Zellen zurückzuführen. Ein solcher Anstieg der Leitfähigkeit tritt in den hier durchgeführten Untersuchungen im CB4-Medium nicht auf. Dies könnte aber daran liegen, dass hier ein Wachstum der Zellen bis zum zehnten Kulturtag (Col. 20, Col. M5) stattfand und die Leitfähigkeit nur bis zum elften (Col. M5) oder dreizehnten (Col. 20) Kulturtag bestimmt wurde.

Die Rosmarinsäureakkumulation beginnt in CB2-Medium bei den hier untersuchten Kulturen zwischen dem vierten und fünften Kulturtag. Wie auch bei anderen, aus demselben Stammkallus angelegten Zelllinien, ist der Beginn der Akkumulation mit dem Ende der Wachstumsphase der Zellen gekoppelt. Die Aktivität der Rosmarin-

säuresynthese beginnt in der Regel einen bis zwei Tage vorher anzusteigen. Für die in dieser Arbeit untersuchten Kulturen ist anzumerken, dass die RAS-Aktivität in Zellen aus CB2-Medium der Kultur Col. M5 überraschend hoch lag und nahezu an die von Zellen dieser Kultur erzielten Werte in CB4-Medium heranreichte. Die Aktivität der RAS lag hier mit $76 \mu\text{kat} / \text{kg}$ in ihrem Maximum am siebten Kulturtag um den Faktor 1.7 höher, als die für die Kultur Col. 20 gemessenen Werte.

Die RA-Akkumulation erreichte ihr Maximum mit 1,9 % des Trockengewichtes in der Kultur Col. 20 in CB2-Medium bereits am sechsten Tag der Kulturperiode. Danach blieb der Gehalt an RA in den Zellen bis zum dreizehnten Kulturtag mit einem leichten Einbruch zum achten Kulturtag auf einem Niveau und fiel nicht, wie für andere *Coleus*-Suspensionen beobachtet, zum Ende der Kulturperiode hin ab. Ein Grund hierfür könnte die für diese Kultur in CB2 beobachtete relativ lange stationäre Phase sein, die vom fünften bis zum elften Kulturtag anhält. Erst danach setzt ein Absterben der Zellen ein. Die RA-Akkumulation in der Kultur Col. M5 erreicht ihr Maximum mit 3.7 % des Trockengewichtes am zehnten Tag der Kulturperiode. Da diese Kultur nur bis zum elften Tag untersucht wurde, lässt sich keine Aussage darüber machen, ob die RA-Gehalte danach wieder abnehmen oder noch weiter ansteigen. Bei dem hier beobachteten Rückgang der RA-Konzentration vom zehnten zum elften Tag könnte es sich auch um eine Schwankung der Messwerte handeln kann. Allerdings ist der erreichte RA-Gehalt von 3.7 % des Trockengewichtes für in CB2-Medium angezogene Zellen ungewöhnlich hoch. Zellen aus diesem Medium akkumulieren normalerweise nur maximal 2 % des Trockengewichtes an Rosmarinsäure (Petersen 1993; Meinhard 1995). Ein Grund für die in der Kultur Col. M5 erhöhten Werte könnte die in dieser Kultur recht hohe RAS-Aktivität sein, die am neunten und zehnten Kulturtag noch um den Faktor 2.7 höher liegt als die in der Kultur Col. 20 gemessenen Werte. Allerdings wurden auch bei Meinhard (1995) ähnlich hohe RAS-Aktivitäten in Zellen aus CB2-Medium erzielt, was keine derart erhöhte RA-Akkumulation zur Folge hatte.

Die RA-Akkumulation in Zellen aus CB4-Medium verlief weitgehend normal. Sie begann für alle untersuchten Kulturen zwischen dem fünften und siebten Kulturtag, zeitgleich mit dem Anstieg der RAS-Aktivität. Die höchsten Werte wurden mit 7.4 % des Trockengewichtes durch die Kultur Col. M5 erreicht, die maximale RA-Konzentrationen am zehnten Kulturtag aufwies. In den beiden anderen untersuchten Kulturen Col. 20 und Col. M1 traten die höchsten RA-Gehalte am neunten Tag der Kulturperiode mit 4 % (Col. 20) und 5.2 % (Col. M1) auf. Ähnliche Werte wurden auch bei Meinhard (1995) und Petersen (1993) erreicht, wobei die RA-Gehalte auch bis zu 19 % des Trockengewichtes erreichen können (Petersen und Alfermann 1988). Die Anzucht von Zellen der Kultur Col. M1 in Medien mit höheren Zuckergehalten (CB5, CB6) erbrachte keine weiter gesteigerte Rosmarinsäureakkumulation. In der Kultur lag die RAS-Aktivität für alle Medien im Maximum am siebten Kulturtag um $90 \mu\text{kat} / \text{kg}$. Die RA-Akkumulation war in Zellen aus CB4-Medium mit 5.2 % des Trockengewichtes am höchsten. Dies widerspricht den Ergebnissen von Petersen (1994), wonach mit in CB5-Medium angezogenen Zellen höhere RA-Gehalte erzielt werden konnten. In dieser Arbeit wurde allerdings eine andere Zelllinie aus demselben Stammkallus verwendet, weshalb Variationen in der "Induzierbarkeit" der RA-Synthese durch erhöhte Zuckerkonzentrationen durchaus in kleinerem Rahmen vorkommen können.

Dies sieht man auch an der hier untersuchten Kultur Col. M5, deren RAS-Aktivität in Zellen aus CB4- nicht sonderlich höher ist als in Zellen aus CB2-Medium. Während die RAS-Aktivität in Zellen aus CB4-Medium meist um einen Faktor von 2.5 bis 3 über der in Zellen aus CB2-Medium gemessenen Aktivität liegt, verläuft die RAS-

Aktivität in der Kultur Col. M5 in Zellen aus CB2- und CB4-Medium bis zum siebten Kulturtag auf nahezu gleicher Höhe. Erst ab dem neunten Kulturtag liegt die RAS-Aktivität in Zellen aus CB4-Medium deutlich höher als die in Zellen aus CB2-Medium. Eine weitere Besonderheit der RAS-Aktivität dieser Kultur liegt darin, dass die RAS-Aktivität in Zellen aus CB4-Medium zwei Maxima, am sechsten und am elften Kulturtag, aufweist. Da die Kultur nur bis zum elften Tag charakterisiert wurde, ist es nicht möglich zu sagen, inwieweit die Aktivitäten hier noch steigen oder ob an diesem Tag das wirkliche Maximum der Aktivität erreicht wird. Der Anstieg der Aktivität zum Ende der Kulturperiode ist hier auch nicht auf geringe Proteinkonzentrationen in dem für die Messung verwendeten Extrakt zurückzuführen. Die Zellen waren noch bis zum elften Tag kaum verbräunt und auch die Proteingehalte hatten nicht nennenswert abgenommen.

Die RAS-Aktivität erreicht in ihrem Maximum am sechsten Tag $74 \mu\text{kat} / \text{kg}$ im Gegensatz zu $120 \mu\text{kat} / \text{kg}$ (Col. 20 - Tag 7) und $92 \mu\text{kat} / \text{kg}$ (Col. M1 - Tag 7). Die trotz dieser relativ niedrigen RAS-Aktivität erreichten hohen RA-Gehalte, lassen sich eventuell durch diese langanhaltende Aktivität erklären. Abgesehen von dem leichten Aktivitätseinbruch am achten Kulturtag

ist die RAS bis zum elften Kulturtag in steigendem Maße aktiv, weshalb für die Menge der akkumulierten Rosmarinsäure in diesem Fall wahrscheinlich die Dauer der Synthese und nicht unbedingt die Aktivität der RAS verantwortlich ist. Dies könnte auch erklären, weshalb die RA-Menge in Zellen aus CB2-Medium nur knapp die Hälfte der in Zellen aus CB4-Medium akkumulierten RA erreicht, obwohl sich die Aktivitäten der RAS bis zum neunten Tag kaum unterscheiden.

Die PAL-Aktivitäten in den Kulturen Col. 20 und Col. M5 entsprechen weitgehend den üblichen, in *Coleus*-Suspensionskulturen beobachteten Aktivitäten. Zu beachten ist hier lediglich die verlängerte PAL-Aktivität in Zellen aus CB4-Medium der Kultur Col. M5, die, ausgehend von ihrem Aktivitätsmaximum am sechsten Tag bis zum neunten Tag anhält, während die PAL-Aktivität in der Kultur Col. 20 ihr Maximum erst am siebten Tag erreicht. Die Phase der PAL-Aktivität der Kultur Col. M5 ist also im Gegensatz zur Kultur Col. 20 um einen Tag verlängert und erstreckt sich über vier Tage. Bisher untersuchte Kulturen wiesen meist eine Phase der PAL-Aktivität von drei Tagen auf (Petersen 1993; Gertlowski und Petersen 1993). Phasen verlängerter PAL-Aktivität waren bisher lediglich bei der Zugabe höherer Zuckerkonzentrationen zum Medium zu beobachten (Petersen 1993) und korrelierten dort mit erhöhter RA-Produktion. Demnach könnte also auch die verlängerte Phase der PAL-Aktivität für die im Gegensatz zu den anderen untersuchten Kulturen höhere RA-Akkumulation mitverantwortlich sein.

Zusammengefasst lässt sich über die hier untersuchten Kulturen sagen, dass sie sich weitgehend wie andere, aus demselben Stammkallus angelegte Zelllinien, verhalten. Eine Ausnahme bildet die Kultur Col. M5. Sie weist in Zellen aus CB2-Medium relativ hohe RAS-Aktivitäten und in Zellen aus CB4-Medium eine verlängerte Phase der PAL-Aktivität, sowie eine bis zum elften Kulturtag ansteigende RAS-Aktivität auf, die aber bis zum neunten Kulturtag kaum höher als die in Zellen aus CB2-Medium gemessene RAS-Aktivität ist. Daraus lässt sich schließen, dass die RAS-Aktivität der Kultur Col. M5 nicht so gut durch Zuckerzugabe zu "induzieren" ist wie in anderen, aus demselben Stammkallus angelegten Kulturen. Dies scheint aber auf die RA-Syntheseleistung keinen Einfluss zu haben. Der Mangel an Aktivität der RAS wird hier wahrscheinlich durch eine längere Aktivitätsphase der PAL und der RAS ausgeglichen.

4.2: Expressionsstudien

4.2.1: Expressionsmuster der PAL

Vergleicht man die Akkumulation der PAL-spezifischen mRNA mit der Enzymaktivität im Verlauf der Kulturperiode, so fällt auf, dass die mRNA-Akkumulation in Zellen aus CB2-Medium grundsätzlich um einen bis zwei Tage vor der gemessenen Enzymaktivität ihr Maximum erreicht. Dies ist insofern ungewöhnlich, als dass die Enzymaktivität durchaus innerhalb einer bis weniger Stunden nach Beginn der mRNA-Akkumulation einsetzen kann. So beginnt die Akkumulation von PAL-spezifischer mRNA in *Nicotiana*-Zellkulturen nach der Behandlung mit Methyljasmonat bereits zwei Stunden später (Sharan et al. 1998). Die maximale mRNA-Akkumulation wurde hier nach sechs Stunden erreicht. Korrespondierend dazu konnte Enzymaktivität ebenfalls nach zwei Stunden detektiert werden. Die Enzymaktivität erreichte ihr Maximum 17 Stunden nach der Elicitierung. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Induktion der PAL-Aktivität durch Elicitoren von Joos und Hahlbrock (1992), Fritzmeier et al. (1987) und anderen gemacht. Normalerweise führt also eine mRNA-Akkumulation spätestens fünf Stunden später zu einem entsprechenden Anstieg der Enzymaktivität (Fritzmeier et al. 1987). Da in dieser Arbeit etwa alle 24 h RNA isoliert und die Enzymaktivität bestimmt wurde, wären Zeitdifferenzen von etwa fünf Stunden zwischen Transkription und dem Einsetzen der Enzymaktivität nicht aufgefallen oder hätten maximal eine Differenz von einem Tag bewirkt. Für die PAL-Aktivität in Zellen aus CB2-Medium ergibt sich aber eine deutlichere Verschiebung. Hier steigt die Enzymaktivität zunächst vom ersten auf den zweiten Kulturtag zusammen mit der mRNA-Menge nahezu parallel an. Danach fällt aber die Menge der mRNA deutlich zum dritten Tag hin ab, die PAL-Aktivität steigt aber weiterhin bis zum vierten Kulturtag an. Das erste Maximum der Enzymaktivität tritt also zwei Tage nach dem Maximum der PAL-spezifischen mRNA-Akkumulation auf. Diese Beobachtung ist konträr zu den von Fritzmeier et al. (1987) und Sharan et al. (1998) gemachten Beobachtungen. Hier erfolgte nach den Maxima der PAL-spezifischen RNA-Akkumulation ein Anstieg der Enzymaktivität nur noch für nur wenige Stunden um dann auf ein Grundniveau zu sinken. Bei den hier zitierten Arbeiten wurde allerdings in allen Fällen mit Elicitoren gearbeitet, die der Pflanze oder der Zellkultur Infektionen mit phytopathogenen Organismen vorspielen und somit eine schnelle Antwort der pflanzen-eigenen Abwehr erwarten lassen. In diesen Fällen ist eine rasche Induktion der PAL-Aktivität und eine folgende Deaktivierung oder ein Abbau der PAL notwendig. Ein solcher Fall liegt bei der hier untersuchten Zellkultur nicht vor, da die Kultur über ihre normale Wachstumsphase untersucht wird und keinen Stresssituationen ausgesetzt ist. Es ist also durchaus möglich, dass die Deaktivierung der PAL langsamer vonstatten geht, als in einer durch Elicitoren stimulierten Kultur. Ebenfalls ist es nicht gänzlich auszuschließen, dass posttranslationale Faktoren die Enzymaktivität beeinflussen. Dies wurde zum Beispiel bei Tomaten (Lee et al. 1992) beobachtet. Eine weitere Erklärung ist die Möglichkeit, dass mit der in dieser Arbeit benutzten Sonde PAL-19 unter den angewendeten Hybridisierungsbedingungen nicht alle eventuell vorhandenen Transkripte anderer PAL-Isoformen erfaßt wurden. Die einzelne, mit dieser Sonde im Northern Blot detektierte Bande könnte zwar bedeuten, dass lediglich ein PAL-Gen vorliegt, wie es auch bei z.B. Sonnenblumen oder Bambus der Fall ist (Sarma und Sharma 1999), es wäre aber auch möglich, dass lediglich eine Isoform spezifisch detektiert wird. In diesem Fall müsste aus den für Zellen in CB4-Medium ermittelten Werten geschlossen werden, dass lediglich diese

Isoform für den Verlauf der PAL-Aktivität in Zellen aus CB4-Medium verantwortlich wäre oder dass alle Isoformen ähnliche Expressionskriterien zeigen.

In Zellen aus CB4-Medium verlaufen die Enzymaktivität und RNA-Akkumulation, abgesehen von einem Peak in der RNA-Akkumulation am zweiten Kulturtag, parallel.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine direkte Korrelation zwischen Enzymaktivität und PAL-spezifischer mRNA-Akkumulation lediglich in Zellen aus CB4-Medium nachgewiesen werden konnte. Für Zellen aus CB2-Medium müsste durch weitere Versuche geklärt werden, ob die Verschiebungen zwischen mRNA-Akkumulation und Enzymaktivität auf verschiedene PAL-Isoformen, posttranslatorische Regulation, fehlende Deaktivierung der PAL oder anderen hier nicht aufgeführten Gründen beruht.

4.2.2: Expressionsmuster des möglichen RAS-Klones

Voraussetzung für die Annahme, dass es sich bei dem möglichen RAS-Klon RAS-1.1 tatsächlich um einen RAS-spezifischen Klon handeln könnte und er aus diesem Grund für weitere Untersuchungen in Frage käme, war eine Korrelation zwischen Enzymaktivität der RAS und der Akkumulation klonspezifischer mRNA. Aus diesem Grund wurden Expressionsstudien mit diesem Klon durchgeführt. Die Ergebnisse, die eine eindeutige Parallelität zwischen mRNA-Akkumulation und Enzymaktivität für Zellen aus CB2- sowie CB4-Medium zeigen, erlauben diese Annahme. Allerdings wird der pflanzliche Metabolismus durch eine Vielzahl von Signalen gesteuert und Zucker, der auch die RA-Synthese stimuliert, reguliert zusätzlich viele andere Funktionen im pflanzlichen Stoffwechsel (Sheen et al. 1999; Gibson et al. 2000). Es wäre hier also durchaus möglich und sogar wahrscheinlich, dass noch andere Gene in derselben Weise reguliert werden wie die RAS. Es muss also davon ausgegangen werden, dass auch andere Proteine ein ähnliches Expressionsmuster zeigen, die aufgrund der engen Vernetzung von Sekundär- und Primärstoffwechsel durch die Benutzung gleicher Metaboliten (Phenylalanin, Tyrosin) und identischer Signalstoffe (Saccharose) nicht einmal aus dem Sekundärstoffwechsel stammen müssen. Ein endgültiger Beweis dafür, dass es sich bei diesem Klon um die RAS handelt, ist die Übereinstimmung des Expressionsmusters mit der Enzymaktivität der RAS demnach nicht. Erst durch die Expression des Klons z.B. in *E.coli*, der dazu in voller Länge vorliegen müsste, und entsprechende enzymatische Tests, würde dieser Beweis geliefert werden können.

4.3: Reinigung der Rosmarinsäuresynthase

Vergleicht man die in dieser Arbeit durchgeführte Reinigung der RAS mit der von Meinhard (1995) durchgeführten Reinigung, ergeben sich hinsichtlich der Reinigungsfaktoren und der Ausbeuten nur geringfügige Unterschiede. Im Allgemeinen lagen die in dieser Arbeit erzielten Reinigungsfaktoren über den durch Meinhard (1995) erzielten Faktoren, die Ausbeute an Protein aber unter den durch Meinhard erreichten Ausbeuten. Diese Differenzen lassen sich durch die Auswahl der nach der Chromatographie weiter verwendeten, Aktivität enthaltenden, Fraktionen erklären. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Enzymaktivitäten weiterverwendet, was zu einer Verbesserung des Reinigungserfolges mit einer gleichzeitigen Reduktion der Ausbeute führen kann. Werden auch

Fraktionen mit geringeren Enzymaktivitäten verwendet, vermindert dies den Reinigungsfaktor, hebt allerdings die Ausbeute an Protein.

Aufgrund der Annahme, dass CoA-abhängige Enzyme an "Reactive Yellow-Agarose" binden, wurde in dieser Arbeit eine zusätzliche Affinitätschromatographie an diesem Material neu eingeführt. Diese Annahme begründete sich auf der von Hohlfeld et al. (1996) sowie Yu und Facchini (1999) unter anderem mit Hilfe dieses Materials durchgeführten Reinigung der Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramin Hydroxycinnamoyltransferase (THT). Die THT band vollständig an den Farbstoff und konnte mit Feruloyl-CoA eluiert werden (Hohlfeld et al. 1996; Yu und Facchini 1999). Da die THT ebenfalls Affinität zu 4-Cumaroyl-CoA, dem hauptsächlichen Substrat der RAS, und Cinnamoyl-CoA, das auch von der RAS akzeptiert wird, zeigt, bestand die Möglichkeit, dass die RAS ebenfalls Affinität zu Yellow-Agarose zeigen würde. Wie die hier durchgeführten Experimente zeigen, war dies nicht der Fall.

Dies deutet darauf hin, dass die Bindung an den Farbstoff nicht aufgrund der generellen CoA-Abhängigkeit der Enzyme zustande kam, sondern möglicherweise aufgrund der Affinitäten für bestimmte Zimtsäurederivate. Die hier auftretenden Unterschiede in der Affinität könnten für die nicht stattfindende Bindung der RAS an das Säulenmaterial verantwortlich sein. So zeigte zum Beispiel die THT aus allen bisher untersuchten Pflanzen grundsätzlich hohe Affinität zu Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA, beides Substrate, die von der RAS zwar umgesetzt werden können, aber nur sehr geringen Umsatz zeigen, was auf eine geringe Affinität zur RAS hindeutet. Für das eigentliche Substrat der RAS, 4-Cumaroyl-CoA, besitzt die THT aus *Papaver* (Yu und Facchini 1999) eine ähnliche Affinität. Die Affinität der THT aus *Solanum* (Hohlfeld et al. 1995, 1996) ist aber im Gegensatz zu der Affinität der RAS zu 4-Cumaroyl-CoA um den Faktor 7 schlechter. Für Caffeoyl-CoA, das von der THT aus *Nicotiana* (Negrel und Javelle 1997) gar nicht umgesetzt wird, ergibt sich für die THT aus *Solanum* eine gleichfalls um den Faktor 7 geringere Affinität. Lediglich das von der RAS ebenfalls umgesetzte Substrat Cinnamoyl-CoA wird auch von den verschiedenen THTs umgesetzt.

Ob es sinnvoll ist, den Schritt der Reinigung über Yellow Agarose in das Reinigungsprotokoll für die RAS einzubeziehen, kann kontrovers diskutiert werden. Wie in der Arbeit von Meinhard (1995) gezeigt wurde, ist es möglich, die RAS auch ohne diesen Schritt rein zu erhalten. Ebenfalls kann die Chromatographie an Yellow-Agarose die native Gelelektrophorese nicht ersetzen. Zusätzlich bewirkt die Chromatographie an Yellow-Agarose einen deutlichen Verlust bei der Ausbeute.

In dieser Arbeit wurden 2,4 kg Zellmaterial aufgearbeitet um ca. 8 µg gereinigtes Protein zu erhalten. Eine bessere Ausbeute wäre somit wünschenswert und essentiell, um den Aufwand zu minimieren, den die Isolation des Proteins in ausreichenden Mengen für eine Sequenzierung zur Zeit darstellt. Andererseits aber bewirkt dieser Schritt eine deutliche Aufreinigung, welche die Isolation der RAS aus dem nativen Gel bedeutend vereinfacht. Da die native Gelelektrophorese, durch das recht geringe mögliche Auftragsvolumen an Protein, den limitierenden Faktor der Reinigung darstellt, ist ein Verlust an Ausbeute vor diesem Schritt mit relativ geringem Mehraufwand auszugleichen. Da in dieser Arbeit hauptsächlich darauf Wert gelegt wurde, die RAS in größtmöglicher Reinheit zu erhalten, wurde der Schritt in der Reinigung belassen.

In den hier durchgeführten Versuchen konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die Ausbeute mit steigender Passagenzahl der für die Aufreinigung verwendeten Kultur sank. Dieser Effekt wurde auch schon bei Petersen (1993) und Meinhard (1995) beobachtet. Ein Schritt zu höheren Ausbeuten wäre es somit auch, während der

Reinigung nur Materialien aus frisch angelegten Suspensionskulturen zu verwenden, die eine hohe RA-Akkumulation und gute RAS-Aktivitäten aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich hier bemerken, dass der in dieser Arbeit eingeführte Schritt der Chromatographie an Yellow-Agarose als nicht zwingend notwendig, aber erleichternd für die Reinigung der RAS angesehen werden kann. Durch diesen Schritt wird ein Reinigungsfaktor von 55.8 erreicht und der Gesamt-Reinigungserfolg vor der nativen Gelelektrophorese von 34.4 (Meinhard 1995) auf 119.34 angehoben. Dies erleichtert die Identifizierung der mit der RAS korrespondierenden Bande nach der nativen Gelelektrophorese erheblich. Um die Reinigung insgesamt effektiver zu gestalten, müsste zum einen ein Ersatz für die native Gelelektrophorese gefunden werden und zum anderen eine Suspensionskultur mit möglichst hoher RAS-Aktivität und geringer Passagenzahl verwendet werden.

4.4: Klonierung der Phenylalanin Ammonium-Lyase

Anhand der drei unterschiedlichen Klone PAL-2, PAL-19 und PAL-22, die während der Klonierung der PAL gefunden wurden, kann man darauf schließen, dass die Phenylalanin Ammonium-Lyase bei *Coleus blumei* wahrscheinlich in einer kleinen Genfamilie vorliegt. Ein Vergleich der DNA Sequenzen von in dieser Arbeit gefundenen Klonen mit bereits bekannten PAL-Klonen aus anderen Pflanzen befindet sich im Anhang unter 6.1.1. Ein endgültiger Beweis für die Organisation in einer Genfamilie müsste allerdings noch durch weitere Untersuchungen erbracht werden, da nicht auszuschließen ist, dass eine Diversität der Gene auch durch die Tetraploidie von *Coleus* zustande kommen könnte.

Die einzelne, mit dem Klon PAL-19 als Sonde erzielte Bande im Northern Blot (siehe 3.7 Abb. 47), ist aller Wahrscheinlichkeit als das Signal mehrerer Banden dieser Größe zu deuten. Da die Klone PAL-19 und PAL-22 beim Durchsuchen der cDNA Banken identische Hybridisierungsmuster zeigten, ist anzunehmen, dass das mit dem Klon PAL-19 erzielte Hybridisierungssignal nicht für das entsprechende Gen spezifisch ist. Da aber aufgrund dieser Annahme lediglich PAL-19 als Sonde für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde, ist es generell nicht auszuschließen, dass durch die anderen Hybridisierungsbedingungen im Northern Blot eine erhöhte Spezifität hervorgerufen wurde. Durch einen Northern Blot mit den Klonen PAL-2 und PAL-22 als Sonde könnte dies untersucht werden.

Die Organisation der PAL in kleineren Genfamilien ist nicht unüblich und meist findet man hier 3 bis 6 unterschiedliche Gene. Solche Genfamilien treten zum Beispiel bei *Oryza* (3-7 Gene), *Arabidopsis* (3-4 Gene) und Petersilie (3-4 Gene) auf (Sarma und Sharma 1999). Es gibt aber auch Pflanzen, bei denen die PAL lediglich in einem Gen codiert ist, wie es zum Beispiel bei *Populus* (Osakabe et al. 1995) der Fall ist. Bei Kartoffeln geht man dagegen von einer 40 bis 50 Gene umfassenden Familie aus, von denen mehr als 10 Gene auch aktiv transkribiert werden (Joos und Hahlbrock 1992).

Die Beobachtung, dass nicht alle Gene der Familie transkribiert und in Folge translatiert werden müssen, ist nicht selten (Sarma et al. 1997). So ist es zum Beispiel bei Tomaten zu beobachten, dass vorgelagerte Stopp-Codons in einigen Genen der Familie zu finden sind. Dies könnte, so Sarma et al. (1997), zu frühzeitigem Abbruch der Transkription und somit zu nicht funktionellen Peptiden führen. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass manchmal trotz unterschiedlicher Gene keine unterschiedlichen Isoformen der PAL aufzufinden sind. So gab es zum Beispiel in Zellkulturen

von Tomaten lediglich eine PAL-Isoform, wohingegen in den Blättern von Tomaten drei Isoformen identifiziert werden konnten (Sarma et al. 1997).

Es wäre also durchaus interessant, festzustellen, wie viele der gefundenen PAL-Gene korrekt translatiert werden und wie viele Isoformen der PAL in *Coleus* vorliegen. Um dies zu erreichen, könnte zum Beispiel mittels RACE-PCR, ausgehend von den in dieser Arbeit gefundenen Teilklonen, die Sequenz entsprechender Vollängenklone ermittelt werden. Anhand dieser Sequenzen könnte man spezifische Sonden für die einzelnen Gene entwerfen, mit denen man die Expression dieser Gene im Verlauf der Kulturperiode untersuchen könnte. Ebenfalls interessant wäre es, PAL-Gene aus *Coleus* zum Beispiel in *E. coli* zur Expression zu bringen. So wäre es unter Umständen möglich festzustellen, ob sich auf diese Weise unterschiedliche Isoformen der PAL ergeben und ob die einzelnen Gene korrekt translatiert werden.

Zusammenfassend lässt sich also über die hier erfolgte Klonierung der Phenylalanin Ammonium-Lyase aussagen, dass die PAL aller Wahrscheinlichkeit nach in einer kleinen Genfamilie mit mindestens drei Genen in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* organisiert ist. Der nächste weiterführende Schritt wäre eine Analyse der kompletten Sequenz dieser Klone, die zum Beispiel über RACE-PCR oder durch erneutes Durchsuchen von cDNA Banken erhalten werden könnten.

4.5: Klonierung der Rosmarinsäuresynthase

4.5.1: Suche in cDNA-Banken

Der hohe Degenerationsgrad und die dadurch notwendig werdenden niedrigen Hybridisierungstemperaturen, 37 °C für die Sonden MP-6 und 10, sind aller Wahrscheinlichkeit nach der Grund für die unspezifischen Resultate mit diesen Sonden beim Durchsuchen der Lambda gt10 cDNA-Bank. Dass mit den Sonden RAS-AB-1 und 2 gar kein Ergebnis erzielt wurde, lag wahrscheinlich daran, dass die Hybridisierungstemperatur nicht unter 40 °C gesenkt wurde. Es ist also nicht weiter verwunderlich, dass die mit den Sonden MP-6 und 10 unter diesen Bedingungen erhaltenen möglichen RAS-Klone, weder im Southern- noch im Northern-Blot mit aus *Coleus* und anderen Pflanzen isolierter DNA bzw. RNA Hybridisierungsergebnisse zeigte. Da aber auch aus den Sequenzen, die durch die neue, in dieser Arbeit erfolgte Proteinisolierung erhalten wurden, nur stark degenerierte Sonden abgeleitet werden konnten, blieb dieses Problem während der gesamten Arbeit bestehen.

Das zweite Problem, das in diesem Zusammenhang auftrat, war die offenbare Seltenheit von RAS- oder RAS-ähnlichen Transkripten in der cDNA-Bank. Selbst unter nicht stringenten Bedingungen konnten nur sehr wenige Hybridisierungen mit Klonen erzielt werden, bei denen es sich aber nie um RAS handelte. Hier konnte auch durch das Erstellen einer neuen cDNA-Bank keine Abhilfe geschaffen werden. Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei der RAS um ein selten abgelesenes Gen handelt, was durch den geringen Prozentsatz der RAS am Gesamt-Proteinanteil der Zellen unterstützt wird, ist es durchaus möglich, dass in einer amplifizierten cDNA-Bank zu wenige Teile des RAS-Gens enthaltende Phagen vorhanden waren, um sie mit den hier gegebenen Möglichkeiten zu detektieren.

Mit einer nicht amplifizierten cDNA-Bank hätten möglicherweise bessere Ergebnisse erreicht werden können, da hier die "Selektion" durch die Amplifikation der in den Phagen klonierten cDNA ausgefallen wäre. Ein solches Experiment wurde allerdings

nicht unternommen, da bessere Aussichten durch den Versuch der Klonierung über PCR oder RT-PCR zu erwarten waren.

4.5.2: Klonierung über PCR

Auch hier war der hauptsächlich limitierende Faktor für das Gelingen der PCR die Spezifität der eingesetzten Primer. Da mit stark degenerierten Primern gearbeitet werden musste, konnten keine zu hohen Annealing-Temperaturen gewählt werden. Niedrige Annealing-Temperaturen allerdings begünstigen unspezifische Amplifikate. Ein weiteres Problem bei der PCR an genomischer DNA ist das Auftreten von Introns, was teilweise zu sehr großen Genen und somit langen PCR-Produkten führen kann. Sind diese zu lang, findet die PCR nicht effizient genug statt oder wird gänzlich verhindert. Die hier erzielten Ergebnisse machen aber deutlich, dass das Mißlingen der Klonierung der RAS über PCR an genomischer DNA vorrangig der zu geringen Spezifität der Primer zuzuschreiben ist.

Der Versuch der PCR an isolierter cDNA aus beiden cDNA-Banken scheiterte ebenfalls an diesem Problem.

4.5.3: Klonierung über RT-PCR

Die Möglichkeit über RT-PCR ein Amplifikat der RAS zu erhalten, ist generell höher als bei konventioneller PCR oder der Suche in cDNA Banken. Der Vorteil gegenüber PCR an genomischer DNA liegt vor allem darin, dass nur aktive, also transkribierte Gene vorliegen. Der Vorteil gegenüber der Suche in cDNA-Banken ist der weggefallene Schritt der Klonierung in Phagen, der immer mit Verlusten behaftet ist.

Dass mit dieser Methode zwei mögliche RAS-Klone isoliert werden konnten, erlaubt aber noch keine endgültige Aussage darüber, ob mit der RT-PCR bessere Ergebnisse erzielt werden konnten, als mit der PCR. Es fehlt noch der Beweis, dass es sich bei dem auf diese Weise isolierten Klon RAS-1.1 und dem mit diesem Klon identischen Klon RAS-0.8 tatsächlich um einen RAS-Klon handelt. Allerdings könnten die unter 4.2.4 diskutierten und unter 3.4.2 beschriebenen Vergleiche der für diesen Klon spezifischen mRNA-Akkumulation mit dem Verlauf der Enzymaktivität der RAS darauf hindeuten.

4.5.4: Southern- und Northern-Blotting

Fragen wirft auch das Ergebnis des Northern Blots, der mit dem Klon RAS-1.1 als Sonde durchgeführt wurde, auf. Hier sind drei Banden deutlich unterscheidbarer Größen zu sehen.

Dass die RAS, ähnlich wie die PAL, in einer Genfamilie organisiert ist, ist aufgrund der Funktion dieses Enzyms eher unwahrscheinlich. Die RAS ist kein Enzym, das als Schaltstelle verschiedener Stoffwechselwege fungiert, wie die PAL, die das Schlüsselenzym vom Primärstoffwechsel in den gesamten Phenylpropanstoffwechsel darstellt. Hier ist keine "Aufteilung" in unterschiedlich regulierbare Isoformen nötig, weshalb es bedeutend wahrscheinlicher ist, dass die RAS als Einzelkopie im Genom vorliegt. Diese These wird auch durch die einzelne im Southern Blot erscheinende Bande unterstützt. Die drei im Northern-Blot erscheinenden Banden deuten aber auf drei mit dem Klon RAS-1.1 hybridisierende Transkripte hin.

Dies könnte unter Umständen dadurch bedingt sein, dass das *Coleus blumei* als natürliche Hybride einen tetraploiden Chromosomensatz besitzt (Bennett und Leitch 1995). Aus diesem Grund wäre es möglich, dass unterschiedliche Genomkopien und somit auch unterschiedliche RAS-Gene vorliegen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine unspezifische Hybridisierung des RAS-1.1 Klonen mit anderen Transkripten. Die könnte aufgrund von Strukturen im 3' Bereich des Klonen der Fall sein, da das klonierte Fragment in der RT-PCR mit oligo-dT als zweiten Primer amplifiziert wurde. Eine generell unspezifische Hybridisierung mit polyA⁺-RNA konnte aber nicht beobachtet werden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine posttranskriptionale Modifikation der RNA, bei der das ursprüngliche Transkript verkürzt wird. Allerdings entspricht gerade das mittlere der drei detektierten RNA Fragmente der erwarteten Größe des RAS-Proteins. Die Größe von 1.8 kb entspricht, ausgehend von einer mittleren Molekularmasse von 110 Da für die durchschnittliche Aminosäure (Stryer 1991), einem Protein von ca. 55 kDa. Die Molekularmasse der RAS konnte über SDS-PAGE mit ca. 53 kDa bestimmt werden. Die mit einer Länge von 1.5 kb detektierte Bande käme also nicht als Modifikationsprodukt der größeren Banden, sondern höchstens als Abbauprodukt in Frage.

4.5.5: RACE-PCR

Die unspezifischen Ergebnisse der RACE-PCR sind zumindest im Fall des in 3'-Richtung mit dem genspezifischen Primer GSP-1-F erzielten Amplifikates auf den Primer zurückzuführen. Die Sequenz dieses Primers konnte vollständig im Amplifikat wiedergefunden werden, das aber ansonsten keine Homologien mit der Gensequenz des RAS-1.1-Klonen aufwies. Trotz der Länge von 29 bp trat die Sequenz offensichtlich noch in einem anderen Gen auf, das dann, möglicherweise aufgrund der geringen Menge an RAS-Transkripten in der cDNA, bevorzugt transkribiert wurde. Die Region des RAS-1.1 Klonen, aus der die Primer gewählt wurden und die dazu in der EMBL Datenbank gefundenen Homologien, sind in Abbildung 51 dargestellt.

```

RAS-1.1: ...CCTGCACCAACCCCAAACTCTAGCGTCCCCACACACAAAACGAGTGGTAAAAAGTG
Fun:      ...*ct**acc*ac*c*a*ac*c*a*cg*c***acacacaaaacga*-g**aaaaagtg

RAS-1.1: AGAAAACCACATACCAAAATAGAGCTCTCCAGATGCAAAATATCCACAACAAGAAAAAC
Fun:      agaaa**ca*a****aaa**agag*-c*cca*a*--aaaa*a*cc*caac**a*aaa*

RAS-1.1: AAATGGATAGAACTGTATAACAAAGATCTAATTTTTTGTTCGAGGACTCCTCCTTTT
Fun:      a*a***a*a*aac***a*aacaaa*a*c*a-----

RAS-1.1: CAAAAAGGAAGGAGAACCCGTGATAACCACTCATTGAAAAGGCCAGGCAGAAACCCCA

RAS-1.1: CATGCCTGCGCCTGATCGAAACAGTAACCCGGAAAGAATAGTTGTAATGAAAAAGG...
Hum:      *****cctg-tcgaag-ag*aac*--gaaa*a**ag--g*aa*gaaa*ag*...

```

Abb. 51: Region um die Primer für die RACE-PCR und Homologien mit anderen Genen

Die Sequenzen der für die RACE-PCR verwendeten genspezifischen Primer sind grau hinterlegt. Fun: steht für den *Botrytis* T4-cDNA Klon (EM_FUN: CNS01C1C) und Hum für den menschlichen BAC-Klon CTA-332B2 (EM_HUM: AC005094). "*" bedeuten nicht homologe Basen, "-" eine Lücke in der Sequenz.

Hier ist zu sehen, dass im Bereich des Primers GSP-2 Homologien mit dem T4 cDNA-Klon aus *Botrytis* auftreten. Für den Primer GSP-1 ist lediglich eine geringe

Homologie am 3'-Ende mit dem menschlichen Klon CTA-332B2 festzustellen. Mit den Primern wurden ebenfalls eine Suche in der EMBL-Datenbank nach möglichen Homologien durchgeführt, die aber lediglich Übereinstimmungen unter 30 % mit anderen bekannten Gensequenzen erkennen ließ.

Homologien mit den in Abbildung 51 gezeigten Klonen sind aber in den über die RACE PCR amplifizierten Klonen RAS 3 (amplifiziert mit GSP-1-F), und RAS 2 (amplifiziert mit GSP-2-F) nicht zu finden. Für RAS-3 treten lediglich Übereinstimmungen zu einer Sektion des Genoms von *Pseudomonas aeruginosa* (EM_PRO:AE004711 und AE004837) mit einer Ähnlichkeit von 37 und 51 % sowie Übereinstimmungen von 50 % mit einem Cosmid-Klon von *Streptomyces coelicolor* (EM_PRO:SCL6, SCM1, SCM11 und SCF62) auf. Zusätzlich konnte der Primer GSP-1 in seiner kompletten Sequenz im Klon RAS-3 wiedergefunden werden (siehe 6.1.2.2). Dies bedeutet, dass entweder mindestens ein weiteres Gen mit dieser Sequenz existiert oder dass Teile des RAS-1.1 Gens wiederholt vorliegen. Da in dem so erhaltenen Amplifikat aber auch keine Wiederholungen von Motiven des RAS-1.1-Klones auftreten, ist diese Annahme eher unwahrscheinlich. In den Amplifikaten mit dem Primer GSP-1 in 5'-Richtung konnte der genspezifische Primer nicht wiedergefunden werden. Dies galt ebenfalls für das über die Sequenzierung in 5'-Richtung mit dem zweiten genspezifischen Primer GSP-2 erhaltene Amplifikat RAS-2. Für beide Sequenzen konnte keine Homologie mit der Sequenz des Klons RAS-1.1 gefunden werden. Da in diesen Sequenzierungen auch die, normalerweise zu beiden Seiten des klonierten Amplifikats erscheinenden, Vektorsequenzen fehlten und die durch die Sequenzierung erhaltenen Daten nur sehr schlecht auszuwerten waren, ist das Problem hier aber eher in der Sequenzierung zu suchen. Dies könnte daran liegen, dass die über die RACE-PCR erzielten Sequenzen alle sehr GC-reich waren, was das Sequenzieren oft erschwert.

Die RACE-PCR für den Klon RAS-1.1 müsste also noch die Primer und eventuell die Zyklenparameter betreffend optimiert werden. Ebenfalls kann versucht werden, die bereits erhaltenen Amplifikate unter Berücksichtigung des hohen GC-Gehaltes zu sequenzieren, um eventuelle Übereinstimmungen feststellen zu können.

4.5.6: Sequenzierung der Klone

Vergleicht man die, sich durch verschiedene Leseraster aus der Sequenz des RAS-1.1-Klones ergebenden, sechs möglichen Proteinsequenzen mit in Gendatenbanken gespeicherten bekannten Proteinen und Strukturmotiven, so tritt in einer Sequenz ein normalerweise für die Ca^{2+} -Bindung verantwortliches EF-Hand-Motiv auf. Vergleicht man die Proteinsequenz dieses Leserasters mit Ca-bindenden Proteinen wie Calmodulin, Ca-abhängigen Kinasen, und Troponin (siehe Abbildung 53), so ist auffällig, dass die dort in diesem Motiv konservierten Aminosäuren auch in diesem Leseraster der RAS-1.1 konserviert sind.

```

RAS11: LGLVQVSLLOPQHAKSWKGMENLEATFETLVDAFVFLDKNKDGYSKNEMVDAINEITSG
Calm1: -----TEEELIEAFRVFDRDGDGYISADELRHVM-TNL-G
Calm2: -----EELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVM-TNL-G
Calm3: -----EELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVM-TNL-G
Calm4: -----EEIREAFRVFDKDGNGFISAAELRHVM-TNL-G
Calm5: -----EEIREAFRVFDKDGNGFISAAELRHVM-TNL-G
Calm6: -----DKDGDGQITTKELGTVM-RSL-G
Calm7: -----EDLKEAFKVFDDKQNGYISASELRHVM-INL-G
Cabind1: LKMLGTALLGKRATKSVKKKPFTEVEIKDLRTAFDLDLRNRDGRVTANELQFML-KNL-G
Cabind2: -----FKRFDTNGDGKISLAELTDAL-RTL-G
Cabind3: -----FKRFDTNGDGKISLAELTDAL-RTL-G
Cabind4: -----VELMTPKLLAETAGM-----IGVQEMRDAFKEFDTNGDGEITLAELQQAMQRL-L-G
CaKin1: -----ANDEHLRKAFSYFDKDGNGYILPQELCDAL-KED-G
CaKin2: -----ANDEHLRKAFSYFDKDGNGYIEPDELRNAL-MED-G
TropC: -----TEEELAEAFRILDITNGDGYIDRDELKDIL-LNT-G

RAS11: ERS SGRIAMRRFEEMDWDKNGMVNEKEFLFAFTRVWGIEDADDE-----
Calm1: EKLTNEEVDEMIREADIDGDGQINYEEFVTRPEELAEFCFRVLDKNGDGYIDRDEF AEIIR
Calm2: EKLTDEEVEEMIREADVGDGQINYEEFV-----
Calm3: EKLTDEEVEDEMIREADVGDGQINYEEFV-----
Calm4: EKLTDEEVEDEMIREADIDGDGQVNYEEFVAMMT-----
Calm5: EKLTDEEVEDEMIREADIDGDGQVNYEEFVTMMT-----
Calm6: QNPSESELQDMINEVDADNNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEDE-----
Calm7: EKLTDEEVEQMIIEADLDGDGQVNYDEFV-----
CaBind1: INVSELIHDLIREASHSGNGLINEAEFL-----
Cabind2: S-TSADEVQRMMAEIDTDGDGFIDFDEFI-----
Cabind3: S-TSADEVQRMMAEIDTDGDGFIDFDEFI-----
Cabind4: ERLTPREISEVVREADVNGDGTVDFFEEFVKMSR-----
CaKin1: GDDCVDVANDIFQEVDTDKDGRISYEEF-----
CaKin2: TDDCADVANDIFQEVDTDKDGRISYEEFV-----
TropC: ENVTDLEMDELMDKDGDKNG--RLDFEDEFI-----

```

Abb. 53: Vergleich einer möglichen Proteinsequenz des Klonen RAS-1.1 mit verschiedenen Ca-bindenden Proteinen.

Homologien bezogen auf die Sequenz des Klonen RAS-1.1 sind grau hinterlegt. Calm1-7 bezeichnet unterschiedliche Sequenzen für Calmodulin, bei CaBind1-4 handelt es sich um Ca-Bindeproteine die. Die mit CaKin1 und 2 bezeichneten Sequenzen stehen für Ca-abhängige Proteinkinaseinasen. TropC steht für Troponin C. In der SWALL Datenbank sind die Sequenzen unter folgenden Nummern aufgeführt:

Calm1 = P24044, Calm2 = Q4198, Calm3 = Q9ZTV2, Calm4 = 017500, Calm4 = Q9ZRB3, Calm5 = P05933, Calm6 = Q39890, Calm7 = Q9LDQ9, CaBind1 = P48593, CaBind2 = P94092, CaBind3 = Q9SAR4, CaBind4 = Q9NYY0, CaKin1 = Q9XGR2, CaKin2 = Q27731, TropC = Q918U8

Bei dem Leseraster, in dem diese Homologie auftritt, handelt es sich um das erste Leseraster des komplementären Stranges (Raster 4). Abbildung 54 zeigt die komplette Übersetzung dieses Leserasters in Aminosäuren. Die zu Beginn auftretende Aminosäurenabfolge PAPTP konnte auch bei der Sequenzierung des RAS-Proteins gefunden werden.

```

*PAPTPEFVILNEHQADTCFYLNFSQE*FD*QPSEDLGWPLLSVQPRAPLPIIHSRS*APCRIGTSNPV
EGKRKLEPLNE*EKEGNTDSRKASLGRASQSKTSCSCFYHSLTCHHHFSDENSTSTFLLNKEMRIRSL
LKKGSR*PPRKGFEINLCLRGKQSLFLTSGVH*TI*NNYPFFFLILCVLDRIDFDLVKIPFGVLAQSL
CLLYSKDFYASLRPFLLFLYTIKYSPSKRSPRPFLLHSFFYPSLLAFLLDLSSFDSIRNSPFS LQLFFP

```

GYCFDQAQAWWGFCLAFMSGYHGFSLFEKEESSKTKN*IFVVIQFYFPVFLVVDILHLESSILVCGF
 LTFYHSCVWGR*SLGLVQVSLLPQHAKSWKGMNLEATFETLVDAFVFLDKNKDGYVSKNEMVDAI
 NETTSGERSGRIAMRRFEEMDWDKNGMVNFKEFLFAFTRWVGIEDADDEX

Abb. 54: Mögliche Proteinsequenz des RAS-1.1 Klonen aus dem vierten möglichen Leseraster. Die DNA-Sequenz des Klons, sowie die Übersetzung der anderen Leseraster in Proteine, sind unter 6.1.2.1 aufgeführt. Die auch bei der Proteinsequenzierung gefundene AS-Sequenz PAPTP ist eingerahmt hervorgehoben. Die mit dem EF-Hand-Motiv korrespondierenden AS sind grau hinterlegt. Stoppcodons sind als * dargestellt.

Diese Beobachtung ist insofern interessant, weil für Pflanzen gerade bei zuckerregulierten Vorgängen oft Ca abhängige Proteine eine Rolle spielen (Sheen et al. 1999; Vitrac et al. 2000; Gibson 2000;). Zucker, vor allem Saccharose und Glucose, können regulatorisch in den pflanzlichen Stoffwechsel eingreifen, indem sie zum Beispiel die Transkription bestimmter Gene regulieren und wahrscheinlich auch morphogenetische Entwicklungsvorgänge beeinflussen (Farrar et al. 2000; Gibson et al. 2000). Genregulation über Zuckerkonzentrationen wurde bisher unter anderem bei *Nicotiana tabacum* für mit der Pathogenabwehr assoziierte Gene beobachtet (Herbers et al. 1996) und spielt auch für die Anthocyaninproduktion in *Vitis vinifera* Zellen eine Rolle (Vitrac et al. 2000). Ergänzend spielt Zucker bei der Regulation diverser, für die Pflanze essentieller Funktionen wie Embryogenese, Keimung, Entwicklung des Keimlings, Entwicklung der Blätter, Blütenbildung, Stressantworten, Pathogenabwehr, die Antwort auf Verletzungen, sowie für die Seneszenz eine wichtige Rolle (Sheen et al. 1999).

Calcium ist in Pflanzen bei Signaltransduktionsketten nicht unüblich und wirkt dort normalerweise als klassischer "zweiter Bote" (Vitrac et al. 2000). So fungiert Ca^{2+} zum Beispiel als sekundärer Botenstoff bei der pflanzlichen Antwort auf Pathogene in *Arabidopsis* (Hwang 2000) und spielt in derselben Funktion eine wichtige Rolle bei der Ansammlung von Peroxiden beim hypersensitiven Zelltod (Harding et al. 1997). Calcium gelangt hierbei entweder aus extrazellulären oder intrazellulären Speichern in das Cytoplasma und wirkt dort entweder direkt auf die entsprechenden Zielproteine oder indirekt über Ca-bindende Proteine, wie Calmodulin, die dann ihrerseits Proteinkinasen oder andere Proteine aktivieren (Vitrac et al. 2000).

Eine Ca-Bindestelle nach dem EF-Hand-Motiv bei der Rosmarinsäuresynthese wäre demnach interessant, weil hier eventuell eine Brücke zur Induktion des Stoffwechselweges durch erhöhte Saccharosekonzentrationen im Medium geschlagen werden könnte. Auch die Rosmarinsäuresynthese in den für diese Arbeit verwendeten Kulturen wird durch die Zuckerkonzentration induziert (siehe 1.6; 3.1; 3.2; 3.3). Da eine Steigerung der RA-Synthese vorrangig durch die erhöhte Zugabe von Saccharose und nur bedingt durch die Zugabe der Spaltprodukte Fructose und Glucose zu erreichen ist (Petersen 1993), ist es nicht auszuschließen, dass auch dieser Stoffwechselweg durch Saccharose reguliert wird.

Bislang ist noch nicht bekannt, auf welche Weise die erhöhte Saccharosekonzentration im Medium den Anstieg der Rosmarinsäuresynthese bewirkt. Vorangegangene Untersuchungen konnten aber zeigen, dass die Rosmarinsäuresynthese durch keinen anderen Zucker so deutlich stimuliert wird wie durch Saccharose (Ulbrich et al. 1985; Gertlowski und Petersen 1993). Gegen die Annahme einer generellen Regulation der Rosmarinsäuresynthese durch Erhöhung der Zuckerkonzentration spricht jedoch das Fehlen einer Induzierbarkeit der RA-Synthese durch Zucker in Zellkulturen von *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul und Ellis 1988). Hier bewirkten erhöhte Zuckerkonzentrationen keine wie für die hier

untersuchten Kulturen beschriebene überproportionale Steigerung der Rosmarinsäuresynthese.

Das EF-Hand-Motiv selbst ist in unterschiedlichen Spezies (Tiere, Bakterien, Pflanzen) und in sehr vielen Proteinfamilien vertreten (Lewit-Bentley und Rety 2000). Nakayama et al. (2000) nennen allein 66 Unterfamilien mit diesem Motiv, das nahezu immer für die Bindung von Calcium und in selteneren Fällen von Magnesium verantwortlich ist. Es handelt sich dabei um ein "Helix-Loop-Helix" Motiv, dessen Anordnung sich gut verdeutlichen lässt, wenn man den ausgestreckten Zeigefinger und Daumen der Hand betrachtet. Die Finger verdeutlichen die Stellung der Helices zueinander, die Schleife (Loop) liegt in der Handfläche. Im Normalfall tritt dieses Motiv in Paaren auf. Die EF-Hand ist zwar am häufigsten in Proteinen vertreten, deren Aufgabe es ist, nach der Ca-Bindung andere Proteine zu modifizieren (Calmoduline, Kinasen, Calcine etc), findet sich zum Beispiel aber auch in Cholinesterasen und in einer lytisch wirkenden Transglycosidase bei *E-coli* (Lewit-Bentley und Rety 2000). Es ist also nicht gänzlich unwahrscheinlich, ein solches Motiv in der Rosmarinsäuresynthese anzutreffen, obwohl diese nicht an Proteinmodifikationen beteiligt ist.

Interessant wäre es nun zu untersuchen, ob sich die Aktivität der Rosmarinsäuresynthese in Enzymtests zum Beispiel durch EGTA hemmen, oder durch Ca^{2+} -Zugabe steigern lässt. Dies müsste bei einer durch das EF-Hand-Motiv nahegelegten direkten Regulation der Enzymaktivität durch Ca^{2+} der Fall sein. Sollte sich bei diesen Untersuchungen herausstellen, dass die Rosmarinsäuresynthese tatsächlich direkt über Calcium reguliert wird, wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Regulation im Zuge einer Induktion durch Zucker oder Phosphat auftritt oder ob eine andere Induktion verantwortlich ist. Eine Regulation des RA-Syntheseweges über die Rosmarinsäuresynthese wäre insofern sinnvoll, als dass es sich bei der RAS um das erste, spezifische Enzym dieses Stoffwechselweges handelt.

Die AS-Folge PAPTP wurde zusätzlich zum vierten Leseraster noch im sechsten Leseraster wiedergefunden. Die aus diesem Leseraster ermittelte Proteinsequenz zeigte, wie auch die anderen möglichen Proteinsequenzen, keinerlei Übereinstimmungen mit bereits bekannten Proteinsequenzen oder Strukturmotiven. Welches der sechs möglichen Leseraster nun tatsächlich für das mögliche RAS-Protein codiert, kann allerdings nur über eine Expression des Klonen herausgefunden werden. Eine Vollängenklonierung und anschließende Expression des Klonen wäre also der nächste logische Schritt.

Vergleicht man die durch die verschiedenen Leseraster erhaltenen Proteinsequenzen des Klonen RAS-1.1 mit der Proteinsequenz der THT, die eine ähnliche Reaktion katalysiert wie die Rosmarinsäuresynthese und teilweise dieselben Substrate verwendet, so lassen sich kaum direkte Homologien feststellen. Die Homologien, konservierte Aminosäuren betreffend, liegen für alle sechs Leseraster um die 10 %. Vergleicht man die physiochemischen Eigenschaften der Aminosäuren, wie z.B. Ladung, Polarität oder Hydrophobizität, so erhält man für alle Leseraster Übereinstimmungen zwischen 42 und 45 % mit der THT. Dies ist nicht allzu verwunderlich, da sich beide Enzyme auch bei der Reinigung unterschiedlich verhalten (siehe 4.3 für die Reinigung über Yellow Agarose). Da für die THT bisher leider noch nicht bekannt ist, welche Regionen des Proteins welche Funktionen ausüben, ist ein Vergleich von z.B. CoA- oder Substratbindestellen mit den möglichen Proteinsequenzen des RAS-1.1 Klonen nicht möglich. Aus diesem Grund lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob in den für den Klon RAS-1.1 möglichen Proteinsequenzen entsprechende Strukturen vorliegen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hauptsächlichsten Schwierigkeiten bei der Klonierung der RAS in der Unspezifität und dem hohen Degenerierungsgrad der verwendeten Sonden und Primer lagen. Eine Aussage darüber, ob es sich bei dem über RT-PCR isolierten Klon RAS-1.1 und dem damit identischen Klon RAS-0.8, um eine für die Rosmarinsäuresynthase spezifische Gensequenz handelt, kann noch nicht getroffen werden. Hier müßte noch ein endgültiger Beweis durch die Expression des Klons, z.B. in *E. coli* und ein Nachweis der Enzymaktivität erbracht werden. Um diesen Beweis zu erbringen, wäre eine Vollängen-Klonierung notwendig. Dies könnte zum Beispiel durch eine Suche in cDNA-Banken mit diesem Klon als Sonde oder durch eine Optimierung der RACE-PCR geschehen.

Weiterhin wäre es interessant, eine mögliche Ca-Abhängigkeit der Rosmarinsäuresynthase zu untersuchen, um so eventuell Hinweise darauf zu erhalten, auf welchem Weg die RA-Synthese reguliert wird.

Ebenfalls muss noch geklärt werden, weshalb drei unterschiedlich große Banden im Northern-Blot auftreten.

4.6: Klonierung der 4-Cumarat:CoA Ligase

Die Isolierung von Klonen für die 4CL konnte in dieser Arbeit nicht erreicht werden. Mit den unter 2.10 in Tabelle 10 beschriebenen heterologen Klonen war keine spezifische Hybridisierung möglich, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Heterogenität der einzelnen 4CL-Klone auf DNA-Ebene (Siehe 6.1.3) zurückzuführen ist. So war es zum Beispiel bei der von Fritzmeier et al. (1987) beschriebenen Klonierung der 4CL aus *Solanum* ebenfalls nicht möglich, eine Suche mit heterologen Klonen durchzuführen. Hier ließ sich das Problem dadurch lösen, dass gegen die 4CL aus Petersilie gerichtete Antikörper in der Lage waren, mit dem Protein zu hybridisieren. Eine Detektion der 4CL aus *Coleus* mit solchen Antikörpern wurde allerdings bereits bei Karwatzki (1992) versucht. Hier konnte keine spezifische Kreuzaktivität erreicht werden.

Aus diesem Grund wurden, zusätzlich zu dem Versuch der Klonierung mit heterogenen Sonden, die Klonierung mit Hilfe von speziell entwickelten Sonden und Primern versucht. Mit den zu diesem Zweck aus den in Abbildung 55 hervorgehobenen Konsensussequenzen abgeleiteten Primern und Sonden konnte allerdings ebenfalls kein positives Ergebnis erzielt werden. Die hier verwendeten Sequenzen waren zwar in allen bis zum Zeitpunkt dieser Arbeiten untersuchten 4CL-Genen hochgradig konserviert, doch ist nicht klar, welche Funktion diesen Sequenzen innerhalb des Proteins zuzuschreiben ist und ob die Sequenz nicht in anderen 4CL-Genen variiert. Bei Stuible et al. (2000) wird die Bedeutung mehrerer in bis dahin allen untersuchten 4CL-Genen auftretenden Konsensusmotiven diskutiert. Zum einen handelt es sich dabei um das Motiv SSGTTGLPKG_V, das nicht nur in 4CL Genen sondern auch in Luciferasen, Acetyl-CoA Synthasen und Peptidsynthasen vorkommt, sowie das Motiv GEICIRG, das in allen 4CL-Genen konserviert vorliegt. Mutationen in diesen Motiven resultierten in einer deutlichen Verringerung der Enzymaktivität der 4CL (Stuible et al. 2000). Ebenfalls in dieser Arbeit diskutiert werden Mutationen in den konservierten Sequenzen VDRLKEI_IKYKGFQVAPAELE sowie in der Sequenz PSGKILRK, wobei die letztere in dieser Arbeit als Vorlage für den PCR-Primer 4CL-1r verwendet wurde. Von dem in dieser Sequenz vorkommenden Lysin (K) an der Position 540 wird vermutet, dass dort die Adenylatbildung stattfindet. Eine Punktmutation an dieser Stelle führte zu einem nahezu vollständigen Verlust der Enzymaktivität (Stuible et al. 2000). Mutationen in der Sequenz VDRLKEI_IKYK-

GFQVAPAELE resultierten ebenfalls in einer starken Verringerung der Enzymaktivität. Hier wurden allerdings gleichzeitig die Km-Werte für Caffeat und ATP um ein Fünffaches, bezogen auf den Wildtyp, herabgesetzt.

```
Pet: -----MGDCVAPKEDLIFRSKLPDIYIPKHLPLHTYCFENISKVGDKSCLINGA
Sol: -----MPMDTETKQSGDLIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENLSEFNRPCLIDGA
Pop: -----MEAKNDQAQEFIFRSKLPDIHIPNHLPLHTYCFENLSRFKDNPCLINGP
Pin: -----MANGIKKVEHLYRSKLPDI EISDHLPLHSYCFERVAEFADRPCIDGA
Ory: MGSMEQQQPESAAPATEASPEIIFRSKLPDIATNTLPLHRYCFERLPEVAARPCIDGA
      'R' 'S' 'K' 'L' 'D' 'I' 'Y' 'I' 'P' 'K' 'H' 'L' 'P' 'L' 'H' 'T' 'Y' 'C' 'F' 'E' 'N' 'I' 'S' 'K' 'V' 'G' 'D' 'K' 'S' 'C' 'L' 'I' 'N' 'G' 'A'
```

```
Pet: TGETFTYSQVELLSRKVASGLN--KLGIQQGDITIMLLPNSPEYFFAFLGASYRGAISTM
Sol: NDRIYTYAEVELTSRKVAVGLN--KLGIQQKDTIMILLPNCPEFVFAFIGASYLGAISTM
Pop: TGEIHTYAEVELTSRKVASGLN--KLGIKQGDVILLLLQNSPEFVFAFLGASIIIGAISTT
Pin: TDRTYCFSEVELISRKVAAGLA--KLG LQQGQVVM LLLPNCIEFAFVFMGASVRGAIVTT
Ory: TGGVLTADVDRLSRRLAAALRRAPLGLRRGGVVM SLLRNSPEFVLSFFAASRVGAAVTT
      'S' 'R' 'A' 'L' 'L' 'G' 'L' 'L' 'N' 'E' 'F' 'A' 'S' 'G' 'A' 'T'
```

```
Pet: ANPFFTSAEVIKQLKASQAKLIITQACYVDKVKDYAAEK-NIQIICIDDAP-QDCLHFS-
Sol: ANPLFPAEVVKQAKASSAKIVITQACFAGKVKDYAIEN-DLKVICVDSVP-EGCVHFS-
Pop: ANPFYTPAEVAKQATASKAKLIITQAVYAEKVQEFVKENVHVKIVTVDSPP-ENYLHFS-
Pin: ANPFYKPGEIAKQAKAAGARIIVTLAAYVEKLADLQSHD--VLVITIDDAPKEGCQHIS-
Ory: ANPMSTPHEIESQLAAAGATVVITESMAADKLP SHSHGA--LTVVLIDERR-DGCLHFWD
      'A' 'N' 'P' 'F' 'F' 'T' 'S' 'A' 'E' 'V' 'I' 'K' 'Q' 'L' 'K' 'A' 'S' 'Q' 'A' 'K' 'L' 'I' 'I' 'T' 'Q' 'A' 'C' 'Y' 'V' 'D' 'K' 'V' 'K' 'D' 'Y' 'A' 'A' 'E' 'K' 'N' 'I' 'Q' 'I' 'I' 'C' 'I' 'D' 'D' 'A' 'P' 'Q' 'D' 'C' 'L' 'H' 'F' 'S' 'N' 'D' 'R' 'I' 'Y' 'T' 'Y' 'A' 'E' 'V' 'E' 'L' 'T' 'S' 'R' 'K' 'V' 'A' 'V' 'G' 'L' 'N' 'M' 'P' 'M' 'D' 'T' 'E' 'T' 'K' 'Q' 'S' 'G' 'D' 'L' 'I' 'F' 'R' 'S' 'K' 'L' 'P' 'D' 'I' 'Y' 'I' 'P' 'K' 'H' 'L' 'P' 'L' 'H' 'S' 'Y' 'C' 'F' 'E' 'N' 'L' 'S' 'E' 'F' 'N' 'R' 'P' 'C' 'L' 'I' 'D' 'G' 'A' 'M' 'E' 'A' 'K' 'N' 'D' 'Q' 'A' 'Q' 'E' 'F' 'I' 'F' 'R' 'S' 'K' 'L' 'P' 'D' 'I' 'H' 'I' 'P' 'N' 'H' 'L' 'P' 'L' 'H' 'T' 'Y' 'C' 'F' 'E' 'N' 'L' 'S' 'R' 'F' 'K' 'D' 'N' 'P' 'C' 'L' 'I' 'N' 'G' 'P' 'M' 'A' 'N' 'G' 'I' 'K' 'K' 'V' 'E' 'H' 'L' 'Y' 'R' 'S' 'K' 'L' 'P' 'D' 'I' 'E' 'I' 'S' 'D' 'H' 'L' 'P' 'L' 'H' 'S' 'Y' 'C' 'F' 'E' 'R' 'V' 'A' 'E' 'F' 'A' 'D' 'R' 'P' 'C' 'I' 'D' 'G' 'A' 'M' 'G' 'S' 'M' 'E' 'Q' 'Q' 'Q' 'P' 'E' 'S' 'A' 'A' 'P' 'A' 'T' 'E' 'A' 'S' 'P' 'E' 'I' 'I' 'F' 'R' 'S' 'K' 'L' 'P' 'D' 'I' 'A' 'T' 'N' 'T' 'L' 'P' 'L' 'H' 'R' 'Y' 'C' 'F' 'E' 'R' 'L' 'P' 'E' 'V' 'A' 'A' 'R' 'P' 'C' 'I' 'D' 'G' 'A' 'R' 'S' 'K' 'L' 'D' 'I' 'Y' 'I' 'P' 'K' 'H' 'L' 'P' 'L' 'H' 'T' 'Y' 'C' 'F' 'E' 'N' 'I' 'S' 'K' 'V' 'G' 'D' 'K' 'S' 'C' 'L' 'I' 'N' 'G' 'A'
```

```
Pet: KLMEADES-----EMPEVVINSDDVVALPYS SGT TGLPKGVMLTHKGLVT SVAQQVDGD
Sol: ELIQSDEH-----EIPDVKI QPDDVVALPYS SGT TGLPKGVMLTHKGLVT SVAQQVDGE
Pop: ELTNSDED-----DIPAVEINPDDVVALPYS SGT TGLPKGVMLTHKGLVT SVAQQVDGE
Pin: VLTEADET-----QCPAVKIH PDDVVALPYS SGT TGLPKGVMLTHKGLV SVAQQVDGE
Ory: DLMSDEASPLAGDEDDEKVFDPDDVVALPYS SGT TGLPKGVMLTHRSLST SVAQQVDGE
      'D' 'D' 'V' 'V' 'A' 'L' 'P' 'Y' 'S' 'D' 'G' 'T' 'T' 'G' 'L' 'P' 'K' 'G' 'V' 'M' 'L' 'T' 'H' 'K' 'G' 'L' 'V' 'T' 'S' 'V' 'A' 'Q' 'Q' 'V' 'D' 'G' 'D'
```

```
Pet: NPNLYMHSEDMICILPLFHYS LNAVLCCLRAGVTILIMQKFDIVPFLELIQKYKVTI
Gly: -----AKATILLMPKFDINSLALIHKKHVTI
Sol: NANLYMHSDVLMCVLPLFHYS LNSVLLCALRVGAAIILIMQKFDIAQFLELIPKHKVTI
Pop: NPNLYFHEKDVILCVLPLFHYS LNSVLLCGLRVGSAIILMOKKFEIVTLMELVQKYKVTI
Pin: NPNLYFHSDDVILCVLPLFHYS LNSVLLCALRAGAATLIMQKFNLTTCLELIQKYKVTI
Ory: NPNIGLHAGDVILCALPMEFHYSLNNTIMCGLRVGAAIVMRRFDLAAMMDLVERHRVTI
      'N' 'P' 'N' 'L' 'Y' 'M' 'H' 'S' 'E' 'D' 'M' 'I' 'C' 'I' 'L' 'P' 'L' 'F' 'H' 'Y' 'S' 'L' 'N' 'A' 'V' 'L' 'C' 'C' 'L' 'R' 'A' 'G' 'V' 'T' 'I' 'L' 'I' 'M' 'Q' 'K' 'F' 'D' 'I' 'V' 'P' 'F' 'L' 'E' 'L' 'I' 'Q' 'K' 'Y' 'K' 'V' 'T' 'I' 'A' 'K' 'A' 'T' 'I' 'L' 'L' 'M' 'P' 'K' 'F' 'D' 'I' 'N' 'S' 'L' 'A' 'L' 'I' 'H' 'K' 'K' 'H' 'V' 'T' 'I' 'N' 'A' 'N' 'L' 'Y' 'M' 'H' 'S' 'D' 'D' 'V' 'L' 'M' 'C' 'V' 'L' 'P' 'L' 'F' 'H' 'Y' 'S' 'L' 'N' 'S' 'V' 'L' 'L' 'C' 'A' 'L' 'R' 'V' 'G' 'A' 'A' 'I' 'I' 'L' 'I' 'M' 'Q' 'K' 'F' 'D' 'I' 'A' 'Q' 'F' 'L' 'E' 'L' 'I' 'P' 'K' 'H' 'K' 'V' 'T' 'I' 'N' 'P' 'N' 'L' 'Y' 'F' 'H' 'E' 'K' 'D' 'V' 'I' 'L' 'C' 'V' 'L' 'P' 'L' 'F' 'H' 'Y' 'S' 'L' 'N' 'S' 'V' 'L' 'L' 'C' 'G' 'L' 'R' 'V' 'G' 'S' 'A' 'I' 'I' 'L' 'M' 'O' 'K' 'K' 'F' 'E' 'I' 'V' 'T' 'L' 'M' 'E' 'L' 'V' 'Q' 'K' 'Y' 'K' 'V' 'T' 'I' 'N' 'P' 'N' 'L' 'Y' 'F' 'H' 'S' 'D' 'D' 'V' 'I' 'L' 'C' 'V' 'L' 'P' 'L' 'F' 'H' 'Y' 'S' 'L' 'N' 'S' 'V' 'L' 'L' 'C' 'A' 'L' 'R' 'A' 'G' 'A' 'A' 'T' 'L' 'I' 'M' 'Q' 'K' 'F' 'N' 'L' 'T' 'T' 'C' 'L' 'E' 'L' 'I' 'Q' 'K' 'Y' 'K' 'V' 'T' 'I' 'N' 'P' 'N' 'I' 'G' 'L' 'H' 'A' 'G' 'D' 'V' 'I' 'L' 'C' 'A' 'L' 'P' 'M' 'E' 'F' 'H' 'Y' 'S' 'L' 'N' 'T' 'I' 'M' 'C' 'G' 'L' 'R' 'V' 'G' 'A' 'A' 'I' 'V' 'M' 'R' 'R' 'F' 'D' 'L' 'A' 'A' 'M' 'M' 'D' 'L' 'V' 'E' 'R' 'H' 'R' 'V' 'T' 'I'
```

```
Pet: GPFVPPIVLAIKSPVVDKYDLSSVRTVM SGAAPLGKELEDAVRAKFPNAKLGQGYGMTE
Gly: APVVPPIVLAISKSPDLHKYDLSSIRVLKSGGAPLGKELEDTLRAKFPNAKLGQGYGMTE
Sol: GPFVPPIVLAIKSPVVDNYDLSSVRTVM SGAAPLGKELEDAVRAKFPNAKLGQGYGMTE
Pop: APFVPPVVLAVAKCPVVDKYDLSSIRTVM SGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYGMTE
Pin: APIVPPIVLDITKSPIVSQYDVSSVRIIM SGAAPLGKELEDALRERFPKAI FGQGYGMTE
Ory: APLVPPIVVAVAKSEAAAARDLSSVRMVL SGAAPMGKDIEDAFMAKLP GAVLGGQGYGMTE
      'P' 'V' 'P' 'P' 'I' 'V' 'L' 'A' 'I' 'K' 'S' 'P' 'V' 'V' 'D' 'K' 'Y' 'D' 'L' 'S' 'S' 'I' 'R' 'V' 'L' 'K' 'S' 'G' 'G' 'A' 'P' 'L' 'G' 'K' 'E' 'L' 'E' 'D' 'A' 'V' 'R' 'A' 'K' 'F' 'P' 'N' 'A' 'K' 'L' 'G' 'Q' 'G' 'Y' 'G' 'M' 'T' 'E'
```

```
Pet: AGPVLAMCLAFAKEPYEIKSGA CGTVV RNAEMKIVDPETNASLPRNQGEICIRGDQIMK
Gly: AGPVLTM SLAFAKEPIDV KPG CGTVV RNAEMKIVDPETGHS LPRNQSGEICIRGDQIMK
Sol: AGPVLAMCLAFAKEPFDIKSGA CGTVV RNAEMKIVDPDTGC SLPRNQSGEICIRGDQIMK
Pop: AGPVLMSCLAFAKEPFEIKSGA CGTVV RNAEMKIVDPDTGRS LPRNQSGEICIRGSQIMK
Pin: AGPVLAMNLAFAKNPFPVKSGS CGTVV RNAQIKILDTE TGESLPHNQAGEICIRGPEIMK
Ory: AGPVLMSCLAFAKEPFKVKS GACGTVV RNAELKI IDPDTGKSLGRNLRGEICIRGQIMK
      'A' 'G' 'P' 'V' 'L' 'M' 'S' 'C' 'L' 'A' 'F' 'A' 'K' 'E' 'P' 'F' 'E' 'I' 'K' 'S' 'G' 'A' 'C' 'G' 'T' 'V' 'V' 'R' 'N' 'A' 'E' 'M' 'K' 'I' 'V' 'D' 'P' 'E' 'T' 'N' 'A' 'S' 'L' 'P' 'R' 'N' 'Q' 'G' 'E' 'I' 'C' 'I' 'R' 'G' 'D' 'Q' 'I' 'M' 'K' 'A' 'G' 'P' 'V' 'L' 'T' 'M' 'S' 'L' 'A' 'F' 'A' 'K' 'E' 'P' 'I' 'D' 'V' 'K' 'P' 'G' 'C' 'G' 'T' 'V' 'V' 'R' 'N' 'A' 'E' 'M' 'K' 'I' 'V' 'D' 'P' 'E' 'T' 'G' 'H' 'S' 'L' 'P' 'R' 'N' 'Q' 'S' 'G' 'E' 'I' 'C' 'I' 'R' 'G' 'D' 'Q' 'I' 'M' 'K' 'A' 'G' 'P' 'V' 'L' 'M' 'C' 'L' 'A' 'F' 'A' 'K' 'E' 'P' 'F' 'D' 'I' 'K' 'S' 'G' 'A' 'C' 'G' 'T' 'V' 'V' 'R' 'N' 'A' 'E' 'M' 'K' 'I' 'V' 'D' 'P' 'D' 'T' 'G' 'C' 'S' 'L' 'P' 'R' 'N' 'Q' 'P' 'G' 'E' 'I' 'C' 'I' 'R' 'G' 'D' 'Q' 'I' 'M' 'K' 'A' 'G' 'P' 'V' 'L' 'M' 'S' 'C' 'L' 'A' 'F' 'A' 'K' 'E' 'P' 'F' 'E' 'I' 'K' 'S' 'G' 'A' 'C' 'G' 'T' 'V' 'V' 'R' 'N' 'A' 'E' 'M' 'K' 'I' 'V' 'D' 'P' 'D' 'T' 'G' 'R' 'S' 'L' 'P' 'R' 'N' 'Q' 'S' 'G' 'E' 'I' 'C' 'I' 'R' 'G' 'S' 'Q' 'I' 'M' 'K' 'A' 'G' 'P' 'V' 'L' 'A' 'M' 'N' 'L' 'A' 'F' 'A' 'K' 'N' 'P' 'F' 'P' 'V' 'K' 'S' 'G' 'S' 'C' 'G' 'T' 'V' 'V' 'R' 'N' 'A' 'Q' 'I' 'K' 'I' 'L' 'D' 'T' 'E' 'T' 'G' 'E' 'S' 'L' 'P' 'H' 'N' 'Q' 'A' 'G' 'E' 'I' 'C' 'I' 'R' 'G' 'P' 'E' 'I' 'M' 'K' 'A' 'G' 'P' 'V' 'L' 'M' 'S' 'C' 'L' 'A' 'F' 'A' 'K' 'E' 'P' 'F' 'K' 'V' 'K' 'S' 'G' 'A' 'C' 'G' 'T' 'V' 'V' 'R' 'N' 'A' 'E' 'L' 'K' 'I' 'D' 'P' 'D' 'T' 'G' 'K' 'S' 'L' 'G' 'R' 'N' 'L' 'R' 'G' 'E' 'I' 'C' 'I' 'R' 'G' 'Q' 'I' 'M' 'K' 'A' 'G' 'P' 'V' 'L' 'M' 'L' 'A' 'F' 'A' 'K' 'P' 'P' 'G' 'A' 'C' 'G' 'T' 'V' 'V' 'R' 'N' 'A' 'K' 'I' 'D' 'P' 'D' 'T' 'G' 'K' 'S' 'L' 'G' 'R' 'N' 'L' 'R' 'G' 'E' 'I' 'C' 'I' 'R' 'G' 'Q' 'I' 'M' 'K'
```

```

Pet: GYLNDPESTRTTIDEEGWLHTGDIGFIDDDDELFI VDRLKEIKYKGFQVAPAELEALLL
Gly: GYLNDGEATERTIDKDGWLHTGDIGYIDDDDELFI VDRLKELIKYKGFQVAPAELEALLL
Sol: GYLNDPEATARTIEKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI VDRLKELIKYKGFQVAPAELEALLI
Pop: GYLNDPEATERTVDNDGWLHTGDIGYIDGDDDELFI VDRLKELIKYKGFQVAPAELEAMLI
Pin: GYINDPESTAATIDEEGWLHTGDVEYIDDDDEIFI VDRVKEIKYKGFQVAPAELEALLV
Ory: GYLNNPEATKNTIDAEGWLHTGDIGYVDDDEIFI VDRLKEIKYRGGFQVAPAELEALLN
    GYLN'E'T'T''''GWLHTGD'Y'D'D'E'FIVDR'KE'IKYKGFQVAPAELEA'L'

Pet: THPTISDAAVVPMIDEKAGEVPVAFVVRTNGFT-TTEEEIKQFVSKQVVFYKRIFRVFFV
Gly: THPKISDAAVVPMKDEAAGEVPVAFVVISNGYTDTEDEIKQFISKQVVFYKRINRVFFI
Sol: NHPDISDAAVVPMIDEQAGEVPVAFVVRNGST-ITEDEVKDFISKQVIFYKRISRVFFV
Pop: AHPDISCAVVPMKDEAAGEVPIAFVVRANGSK-ITEDEIKQYISKQVVFYKRISRFFV
Pin: AHPSIADA VVPQKHEEAGEVPVAFVVKSSSE---ISEQEIKEFVAKQVIFYKKIHRVYFV
Ory: THPSIADA VVGLK---FGEIPVAFVAKTEGSE-LSEDDVKQFVAKEVIYKKIREVFFV
    'HP'I'D'AVV''''''GE'P'AFV''''''E''K''''K'V''YK'I''V'F'

Pet: DAIPKSPSGKILRKDLRARIASGDLPK-----
Gly: DAIPKSPSGKILRKDLRAKIAAS-VPK-----
Sol: ETVPKSPSGKILRKDLRARLAAG-ISN-----
Pop: EAIPKAPSGKILRKDLRARLATGDFLIKFDHYMQKQQ
Pin: DAIPKSPSGKILRKDLRSRLAAK-----
Ory: DKIPKAPSGKILRKELRKQLQHLQQEALTN-----
    ''PK'PSGKILRK'LR''L''''''''''''''''''''''''''''''''
  
```

Abb. 55: Proteinsequenzen verschiedener 4CL-Klone:
 Pet = *Petroselinum crispum*, Gly = *Glycine max*, Sol = *Solanum tuberosum*, Pop = *Populus kitakamiensis*, Pin = *Pinus taeda*, Ory = *Oryza sativa*. Die Konsensusmotive, von denen in dieser Arbeit verwendete Sonden oder Primer abgeleitet wurden, sind grau hinterlegt und doppelt unterstrichen. Die Konsensusmotive, aus denen sich die von Ellis (persönliche Mitteilung) verwendeten Primer ableiten, sind grau hinterlegt und umrahmt. Bei den einfach unterstrichenen Sequenzen handelt es sich um die bei Stuible et al. (2000) untersuchten Sequenzen. GKILRK: Primer 4CL-1r; KGVMLTH: Primer 4CL-1f; SVAQQVDG: Sonde 4CL-Kons. 1; CGTVV: Sonde 4CL-Kons. 2,

Die Tatsache, dass mit den in dieser Arbeit ausgewählten Konsensusmotiven abgeleiteten Sonden und Primern kein Ergebnis erzielt werden konnte, weist möglicherweise darauf hin, dass einige dieser Motive, denen noch keine Funktion zugewiesen ist, vielleicht doch nicht in allen 4CL-Genen konserviert vorliegen. Dass mit dem aus dem Motiv PSGKILRK abgeleiteten PCR-Primer kein Ergebnis erzielt wurde, könnte an der zweiten gleichzeitig verwendeten Primersequenz liegen. Allerdings ist es generell wahrscheinlicher, dass die für die PCR verwendete cDNA zu einem für die Expression der 4CL ungünstig liegenden Zeitpunkt isoliert wurde, da der Zeitpunkt der Isolation auf eine maximale Expression der RAS ausgerichtet war. Dies war auch für die beiden durchsuchten cDNA-Banken der Fall. Die Enzymaktivität der 4CL erreicht in Zellkulturen aus *Coleus blumei* ihr Maximum meist am sechsten Kulturtag (Petersen 1993). Die cDNA wurde zwar an diesem Tag aus den Zellkulturen isoliert, es ist aber möglich, dass die Transkriptionsaktivität zu diesem Zeitpunkt bereits nachgelassen hat und nur wenig mRNA für die 4CL vorliegt. Die Tatsache, dass aber auch Klone für die PAL die an demselben Tag ihr Aktivitätsmaximum zeigt, isoliert werden konnten, spricht gegen diese Vermutung. Möglicherweise ist aber für die PAL aufgrund der vermuteten Organisation in einer kleinen Genfamilie (siehe 4.4) mehr spezifische mRNA zu erwarten. Eine Möglichkeit, die 4CL aus *Coleus blumei* zu klonieren, wäre zum einen der Versuch, bestehende cDNA-Banken noch einmal mit Sonden aus funktionsbestimm-

menden Motiven der 4CL zu durchsuchen. Anbieten würden sich hier die Motive VDRLKEILKYKGFQVAPAELE, GEICIRG, oder SGTGLPKGV. Der aus dem Konsensusmotiv GKILRK erstellte Primer kann beibehalten werden. Um ausschliessen zu können, dass die für die Suche gewählten Bedingungen oder die PCR-Parameter verantwortlich für das Fehlschlagen der Klonierung sind, könnte parallel eine Klonierung des Gens aus einer Pflanze versucht werden, für die die Sequenz der 4CL bereits bekannt ist.

Zusammenfassend ist hier zu sagen, dass die größte Wahrscheinlichkeit, die 4CL anhand von heterologen DNA Sequenzen zu klonieren durch die Ableitung von Sonden und PCR-Primern aus funktionsbestimmenden Konsensusmotiven liegt. Möglicherweise muss hierfür eine neue cDNA-Bank angelegt werden.

5: Zusammenfassung

Die Rosmarinsäure-Biosynthese ist ein recht kurzer Weg, der insgesamt nur aus acht Enzymen besteht. Sie beginnt mit zwei parallel laufenden Wegen ausgehend von den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, die sich durch die Veresterung der Zwischenprodukte 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat unter Abspaltung von CoA durch die Rosmarinsäuresynthase vereinigen. Das so entstehende 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat wird nun in zwei weiteren Schritten zu Rosmarinsäure (RA) hydroxyliert. Die komplette Synthese läuft in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* innerhalb von 10 Tagen ab und kann durch die Erhöhung der Saccharosekonzentration im Kulturmedium von 2 auf 4 % gesteigert werden.

Durch diese „Stimulierbarkeit“ der RA-Akkumulation und die kurze Kulturperiode eignet sich dieses System gut für enzymatische Untersuchungen, zumal alle an der RA-Synthese beteiligten Enzyme in der Zellkultur nachgewiesen und isoliert werden konnten. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Eigenschaften aller beteiligten Enzyme weitgehend bekannt, einige Enzyme aus *Coleus* bis zur Homogenität gereinigt und einige Enzyme wie die Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL), und die 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL) aus anderen Pflanzen auf Gen- und Proteinebene sequenziert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ergänzend zu den enzymatischen und biochemischen Untersuchungen, einzelne Gene des Biosyntheseweges zu identifizieren und zu klonieren. Dafür standen heterologe Klone der PAL und 4CL sowie zwei kurze Proteinsequenzen der Rosmarinsäuresynthase (RAS) aus *Coleus blumei* zur Verfügung.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse können nun folgende Aussagen gemacht werden:

Die PAL liegt in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* vermutlich in einer kleinen Genfamilie von mindestens drei Genen vor. Der Grund für diese Aussage sind die drei in dieser Arbeit identifizierten PAL-Klone, die sich deutlich in ihrer DNA und Aminosäuresequenz unterscheiden. Expressionsstudien mit dem Klon PAL-19 zeigten eine deutliche Korrelation mit der Enzymaktivität der PAL in Zellen aus CB4-Medium. In Zellen aus CB2-Medium trat die mRNA-Akkumulation ein bis zwei Tage vor der maximalen Enzymaktivität auf.

Die 4CL aus *Coleus blumei* unterscheidet sich vermutlich relativ stark von den bisher aus anderen Pflanzen bekannten 4CL-Genen. Diese Aussage lässt sich treffen, da es in dieser Arbeit nicht möglich war, anhand von heterologen Sonden eine Klonierung der 4CL aus *Coleus* zu erreichen. Auch eine Klonierung über Konsensussequenzen war nicht möglich.

Da anhand der zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Peptidsequenzen keine Klonierung der RAS möglich war, wurde die Reinigung der Rosmarinsäuresynthase wiederholt. Dabei wurde die Reinigung der Rosmarinsäuresynthase um einen Schritt erweitert. Bei dem zusätzlichen Schritt handelt es sich um eine Affinitätschromatographie an dem Trägermaterial Yellow Agarose. Dieser Schritt ist nicht in der Lage, die native Gelelektrophorese zu ersetzen, erleichtert diese aber durch den so erzielten Reinigungserfolg erheblich. Das gereinigte RAS-Protein wurde tryptisch verdaut und über MALDI-TOF und Nano-ES unter der Anleitung von Prof. Dr. P. Hunziker, Universität Zürich, sequenziert.

Mit aus diesen Peptidsequenzen abgeleiteten Primern konnten über RT-PCR zwei Klone erhalten werden, die sich nach der Sequenzierung als identisch erwiesen. Mit dem Klon RAS-1.1 durchgeführte Expressionsstudien ergaben eine deutliche Übereinstimmung der klonspezifischen mRNA-Akkumulation und der Enzymaktivität der RAS für Zellen aus CB2- und CB4-Medium. Bei einer Übersetzung der DNA-Sequenz in die sechs möglichen Leseraster konnte in zwei Leserastern eine auch in der Proteinsequenzierung aufgetretene Peptidsequenz wiedergefunden werden (siehe 6.1.2). Eines dieser Leseraster weist zusätzlich ein EF-Hand-Motiv, das normalerweise eine Ca^{2+} -Bindung bewirkt, auf.

5.1: Ausblick

Aufbauend auf den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen können nun weitere Ziele verfolgt werden:

So können nun weiterführende Untersuchungen zur Expression der PAL und ihrer einzelnen Isoformen mit spezifischen Sonden durchgeführt werden. Für Zellen aus CB2-Medium könnte so durch weitere Versuche geklärt werden, ob die Verschiebungen zwischen mRNA-Akkumulation und Enzymaktivität auf verschiedene PAL-Isoformen, posttranslationale Regulation, fehlende Deaktivierung der PAL oder anderen hier nicht aufgeführten Gründen beruht.

Auch wäre es durchaus interessant festzustellen, wie viele der gefundenen PAL-Gene korrekt translatiert werden und wie viele Isoformen der PAL in *Coleus* vorliegen. Um dies zu erreichen, muss zunächst mittels RACE-PCR ausgehend von den in dieser Arbeit gefundenen Klonen die Sequenz entsprechender Vollängenklone ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, PAL-Gene aus *Coleus* zum Beispiel in *E. coli* zur Expression zu bringen.

Auch im Bezug auf die RAS ergeben sich interessante Perspektiven.

Hier wäre es zunächst am sinnvollsten, ausgehend von dem in dieser Arbeit erhaltenen Klon RAS 1.1, entweder durch Suche in einer cDNA Bank oder über eine Optimierung der RACE-PCR eine Vollängenklonierung zu erreichen. Ein so erhaltener Klon könnte dann in *E. coli* zur Expression gebracht werden. Auf diese Weise könnte der endgültige Beweis dafür erbracht werden, dass es sich bei dem in dieser Arbeit isolierten Klon RAS-1.1 um einen Teilklon der Rosmarinsäuresynthase handelt.

Weiterhin wäre es interessant, eine mögliche Ca^{2+} -Abhängigkeit der Rosmarinsäuresynthase zu untersuchen, um so eventuell Hinweise darauf zu erhalten, auf welchem Weg die RA-Synthese reguliert wird. In diesem Zusammenhang könnte untersucht werden, ob sich die Aktivität der Rosmarinsäuresynthase in Enzymtests zum Beispiel mit EGTA hemmen, oder durch Ca^{2+} -Zugabe steigern lässt. Dies müsste bei einer durch das EF-Hand-Motiv nahegelegten direkten Regulation der Enzymaktivität über Ca^{2+} der Fall sein. Sollte sich bei diesen Untersuchungen herausstellen, dass die Rosmarinsäuresynthase tatsächlich direkt über Calcium reguliert wird, wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Regulation im Zuge einer Induktion durch Zucker auftritt oder ob eine andere Induktion verantwortlich ist. Eine Regulation des RA-Syntheseweges über die Rosmarinsäuresynthase wäre insofern sinnvoll, als dass es sich bei der RAS um ein, spezifisches Enzym dieses Stoffwechselweges handelt.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit ist eine Klonierung der 4CL aus *Coleus blumei* voraussichtlich nur über Konsensusmotive zu erreichen, die funktionsbestimmend für das Enzym sind (siehe 6.1.3 und 4.6). Mit aus diesen Motiven abgeleiteten Sonden oder PCR-Primern sollte es möglich sein, ein Ergebnis zu erzielen.

6: Anhang

6.1: Sequenzen

N=A,C,G,T; B=C,G,T; D=A,G,T; H=A,C,T; V=A,C,G; K = G,T; M = A,C; R= A,G S=C,G; W=A,T; Y=C,T; I= Inosin

6.1.1: Sequenzvergleich der PAL-Klone

Ein Vergleich der in dieser Arbeit aus Zellkulturen von *Coleus blumei* isolierten PAL-Klone PAL1, PAL2, PAL19 und PAL22 mit bereits bekannten Gensequenzen aus anderen Pflanzen. Homologien sind grau hinterlegt. Tri = *Triticum aestivum*, Pop = *Populus kitakamiensis*, Sol = *Solanum tuberosum*, Lyc = *Lycopersicon esculentum*, Pet = *Petroselinum crispum*, Bet = *Betula pendula*

```

PAL19: -----ATCAGCGCTCCRG-----CATCTCKTCC
Tri:   CGTGACACCTTGCCCTGCCGCTCCGGGGCACGATCACCGCGTCGGG-----TGACCTCGTCC
Pop:   CATCACTCCATGCTTGCCACTACGAGGCACAATCACTGCTTCAGG-----TGATTTAGTTC
Sol:   CATTACCCCGTGTGGCCCTCCGTGGAACGGTCACTGCCTCAGG-----TGATCTGTGCC
Lyc:   CATCACCCCGTGTGGCCCTCCGTGGCAGCATCACTGCCTCGGG-----TGATCTCGTCC
Pet:   CATTACTCCTTGTTGGCCACTCCGGGGTACAATCACTGCTTCTGG-----TGATCTGTGC
Bet:   CGACCTACCGAACTAACACTAAATGT-ATTTTTTTTATCTAAGGGGTATAATGAATTT

```

```

PAL19: CCTTATCCTACATTGCTGGCCTCCKCACCGGCCGCC--CAACT-CCAAGGCTGTGGCC
Tri:   CGCTTTCCTACATCGCCGGCTGGTCACCGGCCGCC--AAACT-CCATGGCGACGGCTC
Pop:   CACTATCCTACATTGCTGGATTACTGACTGGCAGGCC--CAATT-CCAAGGCCACTGGTC
Sol:   CTCTGTCCCTACATTGCTGGTTTGCTCACTGGCAGGCC--TAATT-CCAAGGCTGTGGAC
Lyc:   CTTTGTCTATATTGCTGGTTTGCTCACTGGCAGACC--TAATT-CCAAGGCTGTGGAC
Pet:   CATTGTCTTACATTGCTGGACTTCTCACTGGCCGTCC--GAATT-CTAAGGCTGTGGAC
Bet:   TTATGTTTCAATTTATGTTAGTTATTTGACGGAAAAGCCGACAAAGGTCACAAATTTGAAT

```

```

PAL19: CCACCGGTTCCAGCTCAACGCCAGGAGGCATTCAACCTC-GCCGGCAT-CAACGGTGG
PAL22: -----TMYAAAAAMTGKGGATCCGGGGKCTSCASGAATTCWMATCTGA
Tri:   CGGATGGTTTGAAGGTTAATGCTGCGGAGGCATTTAAGATC-GCCGGCAT-CCAGCACGG
Pop:   CCACCGGAGAAGTGCTAGATGCTGCTGAAGCCTTTAAAGCA-GCTGGCAT-TGAATCTGG
Sol:   CCAGTGGTAGCAAACCTGACGCTGATGAAGCGTTCCGTGTG-GCTGCTGT-TAGTGGTGG
Lyc:   CCAATGGTGAGAACTTAATGCTGAGGAAGCTTTCTGCGTG-GCTGGTAT-TAGTGGTGG
Pet:   CAACTGGAGTAATTCTTAGCCCGAAGAAGCGTTTAAACTT-GCTGGAGT-GGAAAGGAG
Bet:   AAACTCAAACCTTATTGTCTGGCACGAATCATGATTTGTGTGCTGAAATACCAAACATA

```

```

PAL19: CTTTTWCGA--GCTGCA-GCCTAAAGAAGGCCTCGCCCTCGTCAACGGCACGGCCGTGGG
PAL22: AGGWATTGATGCCTKGG-TCTCACTGCAAAGGTCTTCCGTACATACAATRCATCTATTAC
Tri:   CTTCTTCGA--GCTACA-GCCCAAGGAAGGCCTTGCCATGGTGAATGGCACGGCAGTGGG
Pop:   ATTCCTTGA--GTTGCA-GCCTAAAGAAGGCCTTGCTCTAGTTAATGGAACAGTGGTGG
Sol:   ATTTTTCGA--GTTGCA-GCCTAAGGAAGGACTTGCACTTGTGAATGGTACAGCAGTTGG
Lyc:   ATTTTTCGA--GTTGCA-GCCTAAGGAAGGACTTGCACTTGTGAATGGCACAGCAGTTGG
Pet:   ATTTTTCGA--GTTGCA-GCCTAAGGAAGGCCTTGCACTTGTGAATGGAACAGCTGTTGG
Bet:   ACCCTCTGACTATCTTATATCTTATATATATCCG-GCTGGTCAAT--CTTAACATGCAC

```

```

PAL19: CTCCGGCTTGG-CCTCCATCGCTCTCTACGAAGCCAACATCTGTMCGTRCTGTCCGTAG
PAL22: ATTMSNATKAC-----ATGCTGAGTAGGGAGACAAAAKGTGGAGATGTTCCTGAGAAAG
Tri:   CTCAGGCCTTG-CCTCCATGGTCTTTTCGAGGCAAACGTCCTTAGCCTCCTTGCTGAGG
Pop:   CTCTGGCTTGG-CCTCTATGGTCTTTTCGAGACCAACGTTCTTGCTGTCTTATCGGAAC
Sol:   TTCTGGTATGG-CATCAATGTCTGTATGACTCCAATATCTTGCTGTTATGTTTGAAG
Lyc:   TTCTGCTATGG-CATCAATAGTCTGTTTGTAGTCCAATATCTTGCTGTTATGCTGAAG
Pet:   TTCTGGTATGG-CCTCTATGGTACTTTTTGAGGCTAATATATTAGCTGTTTTGGCTGAAG
Bet:   TTTCTTCTCTTCACTAATGATTTTACACCATCCAAAAGCACATGCCAT--AAAA

```


PAL19: TGATTTCCGCTATTTTWWACTGA-AGTCATGAACGGAAAGCCGGAGTTTACCGATCACTTG
 PAL22: TTGTTGTTTATCAGCATGCGAATAAGGAGGTTGCGATCATTGTAATCATCAGCGTGCTG
 Tri: TCTTGTCTGGGCGTCTTCTGTGA-GGTCATGAACGGCAAGCCGGAGTTTACCGACCACTTG
 Pop: TCTTGTCTCAGCAATTTTTGCTGA-GGTTATGAATGGTAAACCTGAATTCAGTACCATTG
 Sol: TTTTATCAGCGATTTTTCGCTGA-AGTGATGAACGGAAAGCCGAATTCAGTACTATTTG
 Lyc: TTTTATCAGCGATTTTTACTGA-AGTGATGAACGGAAAGCCGAATTCAGTACTATTTG
 Pet: TTATGTCAGCGATTTTTCGCTGA-AGTGATGCAAGGAAAGCCAGTTCAGTACCATTG
 Nic: TTCTCTCAGCTATTTTTGCTGA-GGTAATGAATGGAAAGCCGAGTTTACTGACCACTTG
 Bet: TATCACTAGTCTCAGAGTCAATGGTCATCTTTGGAGTACTTGAACCAAAAACCCACCA

PAL19: ACGCACAA-RCGTGAAGCACCACCGG----GGCAGATCGAAGCGGCGGATCATGGAGC
 PAL22: TCTCAAAGTCTCATAGTGCTCAGATGTTGCGCTTGAATGAAAAGATAGAAGAWCTAAAGG
 Tri: ACCCATAA-GTTGAAGCACCACCCG----GGCAAATTGAGGCCGCCGATCATGGAGC
 Pop: ACACACAA-ATTGAAGCACCATCCAG----GTCAAATTGAGGCTGCAGCTATAATGGAGC
 Sol: ACACACAA-GTTGAAGCATCACCTG----GTCAGATTGAGGCTGCTGCTATTATGGAAC
 Lyc: ACACACAA-GTTGAAGCATCACCTG----GTCAGATTGAGGCTGCTGCTATTATGGAAC
 Pet: ACGCATAA-GTTGAAGCACCATCCGG----GCCAAATTGAGGCTGCAGCTATAATGGAAC
 Nic: ACACACAA-GTTGAAGCATCACCCG----GACAAATTGAGGCTGCTGCTATTATGGAAC
 Bet: ACCAAAA-CGTCCACTACTATCCTTCCATGCAATTTCTACGCATCTTCACCAACAAAA

PAL19: ACATTTCTTAACGGCAGCGCTACGTGAAGGCGGCGCAGAAGCTGCACGAAATGGATCCCC
 PAL22: GTGTATTGGAAGA-A--CTGGAAACAGATTTGGCTAGGGCGAAAAAKGGGA-AGCCCCC
 Tri: ACATCCTTGAAGGCGCTCTACATGATGCTCGCAAAGAAGCTCGGTGAGCTTGACCCAC
 Pop: ACATTTTATGATGGCAGCGCTTACATGAAGGCGCTAAGAAGTTGCATGAAACGGACCCCC
 Sol: ACATTTTGGATGGCAGCTCTTATGTCAAGGCGCTCAGAAGCTCCATGAAATGGATCCTC
 Lyc: ACATTTTGGATGGAAGCTCTTATGTGAAGGTAGCTCAGAAGCTCCATGAAATGGATCCTC
 Pet: ACATTTTGGATGGAAGCGCTTATGTGAAGGCTGCTCAGAAGCTTCATGAAATGGATCCAT
 Nic: ACATTTTGGATGGTAGCTCTTATGTGAAGGCGGCTCAGAAGCTTCACGAAACGGATCCTC
 Bet: ACTTCACCAACTCCACCCTTTA-ATTAAACTCTGGATCAATTATCATGCACCAACCCCTC

PAL19: TACAGAAA---CCGAAGCAGGATAGGTA-CGCT---CTGAGAACTTCGCCGAGTGGCTG
 PAL22: TTGAAGAGTGCTGATGGGAAGCAAAGAGGAAT---TTAAATCCTGAT-GCATTGGAAA
 Tri: TGATGAAG---CCAAAGCAAGATAGGTA-TGCA---CTCCGCACATCGCCGAGTGGCTT
 Pop: TGCAGAAA---CCAAAGCAGGATCGCTA-TGCT---CTAAGGACTTCACCCCAATGGCTT
 Sol: TTCAAAAA---CCAAAGCAAGATCGTTA-TGCT---CTCCGAACATCTCCACAATGGCTT
 Lyc: TTCAAAAA---CCAAAGCAAGATCGTTA-TGCT---CTCCGAACATCTCCACAATGGCTT
 Pet: TACAGAA---CCGAAACAGGACAGATA-CGCT---CTTAGAACATCTCCTCAGTGGCTT
 Nic: TCCAAAAA---CCAAAGCAAGATCGTTA-TGCT---CTTAGAACGTCGCCCAATGGCTT
 Bet: TCAAACTACTATAAATAGATGACACCAACTACTTCCCTCCAAACTCATAAACAGTTAC

PAL19: GGCCCGCAAGTCGAG--GTGATCCGCACCGCCACGAAGATGATCGAAAGGGAGATCAA--
 PAL22: AAAAGATTGCTCAA--CCCATGCGAAGATTGAAAAATGGA--AAGAGAWAAATTGACA
 Tri: GGCCCTCAGATTGAG--GTCATCCGTGCTGCCACCAAGTCAATCGAGCGTGAGATCAA--
 Pop: GGTCCTCAGATTGAA--GTAATCCGATTCTCGACCAAGTCAATTGAAAGAGAGATTA--
 Sol: GGCCCTCAGATTGAA--GTCATTCGTGCTGCAACAAAGATGATCGAGAGGGAGATCAA--
 Lyc: GGACCTCAGATTGAA--GTCATTCGTGCTGCAACTAAGATGATCGAGAGGGAGATTA--
 Pet: GGTCTCAGATTGAA--GTGATCCGATCATCGACCAAGATGATTGAAAGAGAGATTA--
 Nic: GGCCCTCAAATTGAG--GTCATCCGTTCTGCAACCAAGATGATTGAGAGGGAGATTA--
 Bet: CACTACTCAATTGAAAGGGAAATCTCCTTCAAATCCGGTAATTAATGGCAACATTCAA

PAL1: -----AAAACCTAACATATT
 PAL19: ----CTCCGTCAACGACAACCCGTTG-ATCGATGTTTCTAGAAACAAGGCCTTACACGGT
 PAL22: -----TGGGTACATCAAAGATCAACTACCTTGAWCCC
 Tri: ----TTCCTGCAACGACAACCCACTC-ATCGATGCTCCCGCGGCAAAGCTATCCATGGT
 Pop: ----TTCAGTGAACGACAACCCCTTA-ATTGATGTTTCAAGGAACAAGGCTATACATGGT
 Sol: ----CTCAGTGAACGACAATCCATTG-ATCGATGTTTCAAGAAACAAGGCATACATGGT
 Lyc: ----CTCAGTGAACGACAATCCATTG-ATCGATGTTTCAAGAAACAAGGCCTTACATGGT
 Pet: ----CTCTGTCAATGATAACCCATTG-ATTGATGTTTCAAGGAACAAGGCTATTACACGGT
 Nic: ----TTCAGTGAACGACAACCCCTTG-ATCGATGTTTCAAGAAACAAGGCATTACACGGT
 Bet: CATGCCGCTCCAGCAACCATCCCTCT-CCCAAAGACACTGCAACCTCATTTGTGTGTC

PAL1: GGAAGAGGTTGCGCCATTCCAAGC-CTCGAGGCATTTCAA CAATGGATCAACTATGAGCCC
 PAL2: -----ATTTCAACAATGGATCAACAATCAACCC
 PAL19: GGGAAATTT----CCAAGGGACTC-CTATCGGCGTCTCCATGGATAACGCTAGACTGGCCA
 PAL22: AGGATCACTGTTGCATGGTGCAAACGCCATGAAAGTTCTATTTGAAAAGATATTAAAAA
 Tri: GGCAACTT----CCAAGGCACGC-CCATCGGTGTGTCCATGGACAACACCAGGCTTGCCA
 Pop: GGTAACCT----CCAGGGAATC-CAATTGGAGTCTCAATGGATAATGTACGTTTGGCTA
 Sol: GGCAACTT----CCAAGGTACCC-CTATTGGTGTCTCCATGGATAATACAAGATTGGCCC
 Lyc: GGCAACTT----CCAAGGAACCC-CTATTGGTGTCTCCATGGATAATACAAGATTGGCCC
 Pet: GGCAATTT----CCAGGGCACAC-CTATTGGAGTGTGATGGACAATACACGTTTGGCTA
 Nic: GGCAACTT----CCAGGGCACTC-CAATTGGTGTCTCTATGGACAATGCTAGATTAGCCC
 Bet: AGAAAATT----CTCATATGTCA-GCCCCTCTACATTGGAAGAAAGCCGCAGAGGCACTC

PAL1: AT-TGCTCAACGCC----GTGAACACCTTCTCA----CCCTCTTCCCGGGCGACACCGT
 PAL2: AT-TGCTCAAAGCA----GTGAACACCTTCTCA----CCCTCTTCTCCAGGCGAAACCGT
 PAL19: T--CGCTCCATCG----GAAAACCTGATGTTTG----CTCAATTCTCCGAACCTCG-TCAA
 PAL22: A--GGTCTCTACTG----GAGAAATTTWGCTGGG--CWATGGNTGTTGRTCCGGCTTTC
 Tri: T--TGACGCGATCG----GCAAGCTCATGTTTG----CCCAGTTCTCGGAGCTGG-TGAA
 Pop: T--TGCATCAATAG----GCAAGCTGCTATTTG----CTCAGTTCAGTGAGCTCG-TAAA
 Sol: T--TGCATCAATTG----GGAAATGATGTTTG----CCCAATTCTCGGAGCTTG-TCAA
 Lyc: T--TGCATCAATTG----GTAAATGATGTTTG----CCCAATTCTCAGAGCTTG-TCAA
 Pet: T--TGACGCGATAG----GAAAGCTCATGTTTG----CTCAATTTCTGAACCTTG-TAAA
 Nic: T--TGCATCAATAG----GGAAATGATGTTTG----GCCAATTCTCCGAGCTTG-TCAA
 Bet: CAATGCACCCATTTTGGATGAAGTCTGCCGATGGTGTCCCAATTTGCAAAGGTT--CAAA

PAL1: CTTCTCCCCCGTCAAGAATCCAGTCCCAGCTCCTC--CCTGATGAAGCTGTACAGCGGA
 PAL2: CTTCTCCCCCGTCAAAAACCTCCGTCCCCAACTCCTC--CCTGATGAAGCTGTACACCGGA
 PAL19: CGACTTCTACAACAACGGATTGCCTTCCAATCTCTCCGGCGGGAGGGATCC-AGCTTGGA
 PAL22: CGRTTCTAAWATAAAAAAGKGGKTCTGGTAGCGCSTT-GCYKTTTGCYGYGCTTGTGSGGG
 Tri: CGACTTCTACAACAACGGTCTGCCTTCCAACCTCTCCGGCGGGCGCAACCAAGCTTGGA
 Pop: TGATTCTACAACAATGGATTGCCATCGAATCTCACTGCTAGCAGGAATCCAAGTTTGGA
 Sol: CGACTATTACAACAATGGGTTGCCATCTAATCTCACAGCAGGAAGGAATCCAAGCTTGGA
 Lyc: CGACTATTACAACAACGGGTTGCCATCTAATCTGACAGCAGGAAGGAATCCAAGCTTGGA
 Pet: CGATTTTACAACAACGGGTTGCCATCAAATTTGTCTGGAGGGCGTAATCCAAGTTTGGA
 Nic: CGATTACTACAACAACGGATTGCCATCTAATCTGACAGCAGGAAGGAATCCTAGCTTGGA
 Bet: GCATTGACATCGAGGGAACCTCCTTCACAGTTGCTCAAGTCACTGCAATCGCACGCCGCA

PAL1: -TAAGACCTGCAT-TCCTTGATCCTGTTGGGAA-CGGCGGGGTTTCCAGCCTCCAGT---
 PAL2: -TATGACCTGCAA-TCCTTGATCCTGTTGGGAAATCNCGGGTTTCCGGCCTCCAAG---
 PAL19: CTACGCCTTCAARGGGGCTGAAATCGCCATGGCCTCCTACTGCTCCGAGCTCCAATCTTT
 PAL22: -TGTGYKYGCSCGCGCGCGAGCGTSTGCGRG--TGCGGGBGYCGGCCSYSGKCYCCC
 Tri: CTATGGCTTCAAGGGTGCCGAGATTGCCATGGCCTCGTACTGCTCCGAGCTCCAATCTTT
 Pop: TTATGGCTTCAAGGGAGCTGAAATAGCAATGGCCTCCTACTGTTCTGAGCTTCAATCTTT
 Sol: CTATGGTTTCAAGGGAGCTGAAATCGCGATGGCTTCTTACTGCTCGGAACCTCAGTTCTTT
 Lyc: CTATGGTTTCAAGGGGCTGAAATCGCGATGGCTTCTTACTGCTCGGAACCTCAATCTTT
 Pet: TTATGGATTCAAGGGTGTGAAATGCAATGGCTTCTTACTGCTCTGAACCTCAGTTTCTTT
 Nic: CTATGGTTTCAAGGGATCTGAGATTGCCATGGCTTCATACTGTTCAGAACCTCAATCTTT
 Bet: --GTGAAGTGAAGGTTAACCTCAATGAAGCCGCGGCGCGTGACCGCGTGCCCAAAAGT--

PAL1: -GCGACTCTGGCGGCCTCGATTTCCCTTAGGA-----AGGACGGCCTTGAGCTCTTCTCT
 PAL2: -GCGATTCTGGCGGCCTCCACTTCCCTTAGGTT-----AGGACGGCCGTAAGCTCTTCTCT
 PAL19: GGCTAACCCGGTCAACAACAMCCTGCAGAGCGCGGAS-AGCACAACCAAGATGTGAACCT
 PAL22: CGGGGGTCCCCTGYGCCCGTTGTTTCCGKTTGCCGSCYCTSTCKTCCVCGTTTTYTCYTT
 Tri: AGGCAACCTGTGACCAACCATGTTCAAGAGCGCGGAGCAACACAACCAAGATGTCAACTC
 Pop: CGCCAATCCAGTCAACCCATGTGCAAAGTGCCGAGCAGCACAATCAAGATGTTAAACTC
 Sol: GGCAAAATCCAGTGACTAACCATGTTCAAGAGTGCCGAGCAACACAACCAAGATGTGAACCTC
 Lyc: GGCAAAATCCAGTGACTAACCATGTTCAAAAGTGCTGAGCAACACAACCAAGATGTGAATTC
 Pet: AGCTAATCCAGTGACCAACCATGTTCAAAGTGCTGAAACAGCACAATCAAGATGTGAACCTC
 Nic: GGCAAAATCCAGTGACTAACCAGTCAAAAGCGCCGAGCAACACAACCAAGATGTGAACCTC
 Bet: -GCCAATGGGTTGCCGACAATATCTCCCGTG-GAACTGACACATATGGTGTACCAGTG

PAL1: C-GA----ACACTTGGG-TCTTCTGG-AAGAT---GG-AAGTGGTCGCATTC-----
 PAL2: C-GA----ACACCTGGAATNTTCTGGTAAGAT---GGGAANTNCCCACATTC-----
 PAL19: Y-TT----GGGSTTGATCTCGKCCAGAAAAAT-RTKGGGSATTTGGATATWY---TRA-G
 PAL22: GCTCCKGSGGGTYTTGYCTCTCYTTKGGTTCC-CTKTGKKGKCCCGYWYYSYYT
 Tri: T-CT----TGGTCTCATCTCCTCAAGGAAGACTGCAGAGGCCATTGACATAT---TGAAG
 Pop: G-TT----GGGCTTATCTCTTCAAGAAAGACAGCAGAAGCTGTGATATCT---TGAAG
 Sol: C-TT----AGGCTTAATCTCAGCAAGGAAAACAGCTGAGGCTGTGACATCT---TAAAG
 Lyc: C-TT----GGGCTTAATTTTCAGCCAGGAAAACAGCTAAGGCTGTTGATATCT---TGAAG
 Pet: C-TT----GGGCTTAATCTCTTCAAGGAAAACATCAGAAGCTGTTGAAATCT---TGAAA
 Nic: C-TT----GGACTTAATCTCAGCTAGAAAAACAGCTGAAGCCGTGGACATCT---TAAAG
 Bet: GCTT----CGGAGCCACATCACACCGGCGTACCAACAAAACACTGTGACCTCCAACAGAG

PAL1: TTTTCATTGTCCCGTTCTTGAAGGCGTGGTCNACCANCACTGCCTCCAGCTTCTCGCA
 PAL2: CTTCCTC-----
 PAL19: CTCWGTGCGCCGAVGT-TCTCATCGSG-TGTGCAAAGCATTGRATT---RRGCATTTAGA
 PAL22: KKTGTGTGYTYCKCTTCCSTGGYTCCCCYGSCCCCKGKTYCCCBCCCCTYTYCCCY
 Tri: CTCATGTCCTCAACATTCTTGGTCGCGTTGTGCCAGGCTATCGACCTC-CGCCACCTTGA
 Pop: CTCATGTCACAACCTTCTTAGTGGCTCTTTGCCAAGCTATCGACTTG-AGGCACCTTGA
 Sol: CTAATGTCATCAACCTATCTCGTGGCATTGTTGCCAAGCAATAGACTTG-AGGCATTTGA
 Lyc: ATAATGTCATCAACCTATCTCGTGGCTCTTTGCCAAGCTATTGACTTA-CGACATTTGA
 Pet: CTCATGTCCTACTACATTTTTAGTAGGCTCTGCCAAGCAATAGACTTG-AGGCATTTGA
 Nic: CTAATGTCATCCACATATCTAGTTGCACCTTTGCCAAGCAATAGACTTG-AGGCATTTGA
 Bet: CTTATAAGGTTCTCAATGCCGAGTGATCGGGAAAGAGAGTCTTCCGTCGACTTATTC

PAL1: TCAAN-CGGGTTAGCTGCCGCTTGCCANGCGTTCN-TCCACNTTNGGCGAACNNTT
 PAL19: GGGG--TCTRDGGKGGGCGK--GAGAYAMTGKYRW--CMAGTGG-GRAGAGATYTHM--
 PAL22: CCCCCGCTTTTTTCTYGGCCT-TTTTTTTCYKKTTKTTTGGGTGRTTTTTTTKTBGTGTG
 Tri: GGAGAATGTCAAGAATGCTGTCAAGAGCTGCGTGAAGACAGTGGCTAGGAAGACACTG--
 Pop: AGAGAACTTGAAGAGCGCAGTCAAGAACACAGTTAGTCAAGTATCCAAGAGGTTTA--
 Sol: GGAGAACTTGAAGAGTGTGTCAAGAACACAGTTAGCCAAGTAGCTAAGAGAACTTTG--
 Lyc: GGAAAACCTGAAGAGTGTGTCAAGAACACAGTTAGCCAAGTAGCTAAGAGAACTTTG--
 Pet: GGAGAATTTAAAAAGCACTGTCAAAAACACAGTAAGCTCAGTAGCTAAGCGAGTGCTA--
 Nic: AGAAAATCTGAGGAATGCAGTCAAGAACACGGTGAAGCAAGTCCGAAAGAGAACTTTA--
 Bet: AAGGT-AGCGATGCTCGTTTCGCGAAACACACTCATGCAAGGATATTCGGGAATTCGATG

PAL19: ----ACGGGGTAWAGGGR-GKCCTYCTYAADTTTTGAARAGGCTTYCCGKWGGGGAYRWA
 PAL22: ---GGTTGSYTTGGGCGKYTTTTKTTTTGKTTTGTGTGTYCGGGGGGGGGGGTTTTTY
 Tri: ----AGCACTGATAACAATGGCCATCTCCACAACGCACGCTTCTGCGAGAAGGACCTTCT
 Pop: ----ACTACAGGTGCCAATGGAGAAGTTCACCCATCAAGGTTCTGTGAGAAGGATTGCT
 Sol: ----ACAATAGGTGCTATTGGTGAACCTTCATCCAGCAAGATTCTGCGAGAAGGAATTGCT
 Lyc: ----ACAATGGGTGCTAATGGTGAACCTTCATCCAGCAAGATTGAGCGAAAAAGAATTGCT
 Pet: ----ACCATGGGTGCTAACGGGGAACCTCCATCCCTCAAGATTCTGTGAGAAGGATTTACT
 Nic: ----ACAATGGGTACCAATGGAGAAGTTCATCCATCAAGATTCTGTGAAAAGGACTTGCT
 Bet: GGAGATTCTTGAAGCCAT-GGCCAAGCTGATGAACAAAATTTGATCCCCAAACTGCCTC

PAL19: TAMWTTCSCTAATAGAGA---SCTASAGGACWCACCTGATARAAA----KAGAGATTTT
 PAL22: TTKGGKTTGGGKGYTKGYTSGBKTKTTTTTTKTTTTTYTCTYTKKGGKTYTTTTT
 Tri: GCTCACAATCGACCGTGAGGCCGTGTTGCGTACGCAGATGACCCC---TGCAGCGCCAA
 Pop: CAAGGTGGTTGATCGTGAATATGCTTTTGCCTATGTGGATGACCCC---TGCAGTGTAC
 Sol: TCGAGTCGTAGACAGGGAATACTTGTTTACCTATGCTGATGACCCC---TGCAGTCCAC
 Lyc: TCGAGTCGTGGATAGAGAATACTTGTTTGCCTATGCTGATGATCCC---TGCAGTCCAA
 Pet: CAGAGTTGTGGACCGCAATATATTTTTGCATATATTGATGATCCC---TGCAGCGCAAC
 Nic: TCGAGTCGTGGACAGGGAATACGTTCTTCGCTATGCTGACGACGCC---TGCAGCGCTAA
 Bet: TAAGGGGGACCATCACTGCTTCGGGGGATCTTGTACCACTGTCTTATATGCTGGTTTAC

PAL19: DCMCSCTYARAAGGGGAGAAAAAGRS-----CTYCYTYCAGATMCATTTYGGGAGCMCG
 PAL22: YKKGTYTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGGGGGCCGCCCCCCCYCTCYCCCTCCCTCCY
 Tri: CTACCCCTCATGCAGAAGATGCGTGCA-G--TTCTCGTGGAGCACGCCTTGGCCAAATGG
 Pop: CTATCCATTGATGCAGAACTAAGGCAA-G--TTTTTGTGACCATGCGTTGGAAAATGG
 Sol: CTATCCTTTGATGCAGAAGCTGAGACAG-G--TCCTTGTGATCATGCAATGAAGAATGG
 Lyc: CTACCCCTTGTGATGCAGAAGCTGAGACAA-G--TCCTTGTGATCAAGCAATGAAGAATGG
 Pet: CTACCCATTGATGCAAAAATTAAGACAA-A--CACTAGTTGAGCATGCATTGAAGAATGG
 Nic: CTACCCACTGATGCAGAACTAAGGCAA-G--TCCTCGTCGACCACGCCTTGCAAAATGG
 Bet: TAACTGGCCGCCATAATTCCAAAGTGGTCA--CCCCTGAAGATGAAGAAATCACATCCAT

PAL19: SCTTYCAGAAAGCCATACCGGRKAWMCCCTCCAWWSAKRGGTTTTYYYATYTHVRG
 PAL22: CCCCCCCCCGGGGKGGSGSKTKCYCYCTCCCTCWAAAAAATTTKTTTTCTMTWTY
 Tri: TGAGCCGAGGCGCACGTCGAGCGTGGTGTGGCCAGCTTGCCATGTTGAGCAGGA
 Pop: AGAGAATGAGAAGAATTTAGCACTTCAGTCTTCCAAAAGATTGAAGCTTTCGAGGAAGA
 Sol: TGAAAGTGAGAAGAATATCAACAGCTCAATCTTCCAAAAGATTGGAGCTTTCGAGGACGA
 Lyc: TGAAAGTGAGAAGAATGTCAACAGCTCAATCTTCCAAAAGATTGGAGCTTTCGAGGACGA
 Pet: TGACAACGAGAGAACTTGGAGCACTTCCATCTTCCAAAAGATTGCGACCTTTCGAGGATGA
 Nic: CGAAAATGAGAAGAACGCAACAGCTCAATCTTCCAAAAGATACTAGCTTTTGAAGACGA
 Bet: AGAAGCTCTAAAGAGAGCAGGAATTCAGCTCCTTTCGAGCTTCAAGC---CAAGGAGGG

PAL19: RB---RGGKTTTTYTSGGGSATKACCGAGAKAKATTSYTYTTAKCTTTTTTTTTTYCTTKT
 PAL22: TTYTYTTTTTTTTTTTTYGYCYTYTCTYBTTTYTCTSBTYTCTCTYCTCCTCTCYTTTCTCTY
 Tri: GCTC-CGTGCAGTGTGGCCAAAGGAGGTGAGGCGCCGCAAGCGCCGTGGAGAATGGCA
 Pop: ACTG-AAGGCTCTTTTGGCCAAAAGAAGTTGAGAGCGCAAGAGCAGCATATGATAGTGGGA
 Sol: ATTA-AATGCTGTGTTGCCTAAAGAAGTTGAGAGTGCAGAGCTCTTCTTGAAGTGGCA
 Lyc: ATTA-ATCGCTGTGTTGCCTAAAGAAGTTGAGAGTGTAGAGCTGTTTTTGAAGTGGCA
 Pet: ACTA-AAGGCCCTATTGCCTAAAGAAGTTGAAGTGTAGAGCTGCACTCGAAAGTGGAA
 Nic: GCTA-AAGGCCGTGTGGCCAAAAGAAGTCGAGAGTGCAGAGCCGCGCTGGAAAGTGGGA
 Bet: TCTA-GCTCTGTAAATGGGACAGCTGTTGGCTCGGCTGTGGCTGCAACAGTTTGTTTG

PAL19: TYYYTTTTTTTTTTTGTGTGATTAKAGAMATWCGVSSCCTCWYASGC-RGRGVBT-TCA
 PAL22: TCTYCTCTCTTYCCTCYCYCTCYCTCYCTCCYCTTTCYS-----
 Tri: CCGCAGCACAGCAAAACCGTATCGCCGAATGTGGTGTGACCCGCTCTACCGGTTCTGTGC
 Pop: ATTCAGCAATTGACAACAAGATCAAGGAGTGTAGGTCTTATCCACTGTACAAGTTTGTGA
 Sol: ACCCTTCGATTCCTAACAGGATCACAGAATGCAGATCATATCCATTGTACAGGTTGGTGA
 Lyc: ACCCTTTAATTGTAACAGGATCACAGAATGCAGATCATATCCATTGTACAGGTTGGTGA
 Pet: ATCCAGCAATCCCAAACAGGATCGAGGAGTGCAGGTCTTACCCATTGTACAAGTTTGTGA
 Nic: ACCCTGCAATTGCCAACAGGATAAAAGAATGCAGATCTTATCCACTTTACAGGTTTGTGA
 Bet: ATGCCAACATTTTGTCTCTGTTGCAGAAATTCTCTCTGCTCTGTTCTGTGAAGTTCATGC

PAL19: GTDTCTYTTTK-----
 Tri: GCAAGGAGCTTGGAAACGGAGTACTTGACC-GGGGAGAAGACGCGGTCTCCTGGCGAAG-A
 Pop: GGGAGGAGTTGGAACTGTATTGCTCACT-GGCGAAAAGTCCAATCGCCCGGCGAGG-A
 Sol: GACAAGAACTTGGAAACAGAATGTTGACA-GGTGAAAAAGTTCGATCGCCGGGCGAGG-A
 Lyc: GAGAAGAACTTGGAAACAGAATGTTGACG-GGTGAAAAAGTTCGATCACCTGGTGAGG-A
 Pet: GGAAAGAGTTGGAACTGAGTATCTTACA-GGAGAAAAAGTAACGTCACCTGGAGAAG-A
 Nic: GAGGAGAACTTGGAGCTGAATTATTGACG-GGAGAAAAAGTCAGGTCCACAGGTGAAG-A
 Bet: TTGGAAATTCTG-AGTTCACCGACCCACT-GACGCATGAGCTCAAGCACCACCCGGGCCA

6.1.2: Sequenzen der möglichen RAS-Klone

6.1.2.1: DNA-Sequenz und daraus abgeleitete mögliche Proteinsequenzen des Klones RAS-1.1

Stoppcodons sind als * dargestellt. Die Aminosäuresequenzen mit Rahmen sind Motive aus der Proteinsequenzierung die in diesem Leseraster wiedergefunden wurden. Die grau hervorgehobenen Aminosäuren sind in dem EF-Hand-Motiv, das in einem der Leseraster auftritt, konserviert.

tcctcgtcatcggcgtctttcaatgccaacccaacgagtgaaagcaaaaaggaactccttgaa
 S S S S A S S M P T Q R V K A K R N S L K
 P R H R R L Q C Q P N E * K Q K G T P * S
 L V I G V F N A N P T S E S K E L L E
gttcaccatgccattcttgtcccagtcacatctcttcgaatctcctcatggcaattcttccag
 F T M P F L S Q S I S S N L L M A I L P E
 S P C H S C P S P S L R I S S W Q F F Q
 V H H A I L V P V H L F E S P H G N S S R
aagatcgttctccagaagtagtttcatttatagcatcaaccatctcggttttgcacatac
 D R S P E V V S F I A S T I S F L L T Y
 K I V L Q K * F H L * H Q P S R F C S H T
 R S F S R S S F I Y S I N H L V F A H I P
ccatcctgttcttgtccaaaaacacaaatgcatccactaatgtttcaaaagtagcctccag
 P S L F L S K N T N A S T N V S K V A S R
 H P C S C P K T Q M H P L M F Q K * P P D
 I L V L V Q K H K C I H * C F K S S L Q
attcggcatccctttccaagatttagcatgttgggttgagcaggctaacctgcaccaacc
 F G I P F Q D L A C W G W S R L T C T N P
 S A S L S K I * H V G V G A G * P A P T
 I R H P F P R F S M L G L E Q A N L H Q P
ccaaactctagcgtccccacacacaaaacgagtggtaaaaagtgagaaaaccacataccaaa
 K L * R P H T Q N E W * K V R K P H T K
 P N S S V P T H K T S G K K * E N H I P K
 Q T L A S P H T K R V V K S E K T T Y Q N
atagagctctccagatgcaaaatatccacaacaagaaaaacaaatggatagaactgtataac
 I E L S R C K I S T T R K T N G * N C I T
 * S S P D A K Y P Q Q E K Q M D R T V * Q
 R A L Q M Q N I H N K K N K W I E L Y N
aaagatctaatttttgttttcgaggactcctccttttcaaaaaggaaggagaacccgtgat
 K I * F F V F E D S S F S K R K E N P * *
 R S N F L F S R T P P F Q K G R R T R D
 K D L I F C F R G L L L F K K E G E P V I
aaccactcattgaaaaggccaggcagaaaccccaccatgcctgcgctgatcgaaacagtaa
 P L I E K A R Q K P H H A C A * S K Q *
 N H S L K R P G R N P T M P A P D R N S N
 T T H * K G Q A E T P P C L R L I E T V T
cccgaaagaatagttgtaatgaaaaaggagaattacgtatcgaatcgaaggaggacaaatc
 P G K N S C N E K G E L R I E S K E D K S
 P E R I V V M K K E N Y V S N R R R T N P
 R K E * L * * K R R I T Y R I E G G Q I
caaaagaaaggccagaagagaaggataaaaaaaggaatgtaaaaagggcgaggactccttt
 K R K A R R E G * K K E C K K G R G L L L
 K E R P E E K D K K R N V K R G E D S F
 Q K K G Q K R R I K K G M * K G A R T P F
tagaaggagagtactttaatagtatacaaaaaaagaaaaaaggccttaggctagcataaaag
 E G E Y L I V Y K K R K K G L R L A * K
 * K E S T * * Y T K K E K K A L G * H K S
 R R R V L N S I Q K K K R P * A S I K V
tctttcgaatataaaaagacacaaggattgggctaaaaccccgacggaattttaaccaaatc
 S F E Y K R H K D W A K T P N G I L T K S
 L S N I K D T R I G L K P R T E F * P N Q
 F R I * K T Q G L G * N P E R N F N Q I
aaaatcaatgcatcaagaacacacaaaataagaagaagaagggttaattatttcatatag
 K S M R S R T H K I R K K G * L F H I V
 N Q C D Q E H T K * E R R K G N Y F I *
 K I N A I K N T Q N K K E E R V I I S Y S

tctaatgtacacccgaggtcaagaaaagactttgtttgcctctcaaacaaaggttgatttca
 * C T P E V K K R L C L P L K Q R L I S
 S N V H P R S R K D F V C L S N K G * F Q
 L M Y T R G Q E K T L F A S Q T K V D F K
aatccctttcttgggtggttaccgagatccctttcttcaagagcgatcgaattcgcatttcttt
 N P F L G G Y R D P F F K S D R I R I S L
 I P F L V V T E I L S S R A I E F A F L Y
 S L S W W L P R S F L Q E R S N S H F F
attaagagaaaagttgacggtgaattctcgtcagagaagaaatgatggcaagtgagcgagt
 F K R K V D V E F S S E K K * W Q V S E W
 L R E K L T L N S R Q R R N D G K * A S
 I * E K S * R * I L V R E E M M A S E R V
ggtagaagcaggagcaactggctttgattgagacgctcggcccaagaggcctttcttgaa
 * K Q E Q L V F D * D A R P K E A F L E
 G R S R S N W S L I E T L G P K R P F L N
 V E A G A T G L * L R R S A Q R G L S * I
tctgtatttcttctttcttactcgttcagggctcaagctttcgtttccctcaacggg
 S V F P S F S Y S F R G S S F R F P S T G
 L Y F L L S L T R S G A Q A F A F P Q R D
 C I S F F L L L V Q G L K L S L S L N G
atttgaagtcccaatcctacacggcgcctaagacctaagaatgaataatcggaaggggtgctc
 F E V P I L H G A * D L E * I I G R G A L
 L K S Q S Y T A P K T * N E * S E G V L
 I * S P N P T R R L R P R M N N R K G C S
ttggttggactgatagcaagggccatagaccatcctccgatggttgctaataaatcactct
 G W T D S K G H R P S S D G C * S N H S
 L V G L I A R A I D H P P M V A N Q I T L
 W L D * * Q G P * T I L R W L L I K S L L
tgaaagctattgagatagaagcaggtgtccgcttgatgctcattcaggattacaaatggagt
 * K L L R * K Q V S A * C S F R I T N G V
 E S Y * D R S R C P L D A H S G L Q M E *
 K A I E I E A G V R L M L I Q D Y K W S
aggggcaggcta
 G A G X
 G Q A X
 R G R L

Ras-1.1-revers-komplementärer Strang

tagcctgcccctactccatttgtaatcctgaatgagcatcaagcggacacctgcttctat
 * P A P T P F V I L N E H Q A D T C F Y
 S L P L L H L * S * M S I K R T P A S I
 A C P Y S I C N P E * A S S G H L L L S
ctcaatagctttcaagagtgatttgattagcaaccatcggaggatggtctatggcccttg
 L N S F Q E * F D * Q P S E D G L W P L
 S I A F K S D L I S N H R R M V Y G P C
 Q * L S R V I * L A T I G G W S M A L A
ctatcagtcacaagagcacccttccgattattcattctaggtcttaggcgcctgtg
 L S V Q P R A P L P I I H S R S * A P C
 Y Q S N Q E H P F R L F I L G L R R R V
 I S P T K S T P S D Y S F * V L G A V *
aggattgggacttcaaatcccgttgagggaaagcgaaagcttgagcccctgaacgagtaa
 R I G T S N P V E G K R K L E P L N E *
 G L G L Q I P L R E S E S L S P * T S K
 D W D F K S R * G K A K A * A P E R V R

gagaaagaaggaaatacagattcaagaaaggcctctttgggcccagcgtctcaatcaaag
 E K E G N T D S R K A S L G R A S Q S K
 R K K E I Q I Q E R P L W A E R L N Q R
 E R R K Y R F K K G L F G P S V S I K D
accagttgctcctgcttctaccactcgcctcacttgccatcatttcttctctgacgagaat
 T S C S C F Y H S L T C H H F F S D E N
 P V A P A S T R S L A I I S S L T R I
 Q L L L L L P L A H L P S F L L * R E F
tcaacgtcaacttttctcttaataaagaatgccaattcgatcgctcttgaagaaagga
 S T S T F L L N K E M R I R S L L K K G
 Q R Q L F S * I K K C E F D R S * R K D
 N V N F S L K * R N A N S I A L E E R I
tctcgttaaccaccaagaaagggatttgaatcaacctttggttgagaggcaaacaaagt
 S R * P P R K G F E I N L C L R G K Q S
 L G N H Q E R D L K S T F V * E A N K V
 S V T T K K G I * N Q P L F E R Q T K S
cttttcttgacctcgggtgtacattagactatatgaaataattaccctttcttctttctt
 L F L T S G V H * T I * N N Y P F F F L
 F S * P R V Y I R L Y E I I T L S S F L
 F L D L G C T L D Y M K * L P F L L S Y
attttggtgttcttgatcgcattgattttgatttggttaaaattccggttcggggtttta
 I L C V L D R I D F D L V K I P F G V L
 F C V F L I A L I L I W L K F R S G F *
 F V C S * S H * F * F G * N S V R G F S
gccaatccttggtcttttatattcgaaagacttttatgctagcctaaggccttttttt
 A Q S L C L L Y S K D F Y A S L R P F F
 P N P C V F Y I R K T F M L A * G L F F
 P I L V S F I F E R L L C * P K A F F S
cttttttgataactattaagtactctccttctaaaaggagtcctcgccttttttacat
 L F L Y T I K Y S P S K R S P R P F L H
 F F C I L L S T L L L K G V L A P F Y I
 F F V Y Y * V L S F * K E S S P L F T F
tccttttttatccttctcttctggcctttcttttgatttgcctccttcgattcgata
 S F F Y P S L L A F L L D L S S F D S I
 P F F I L L F W P F F W I C P P S I R Y
 L F L S F S S G L S F G F V L L R F D T
cgtaattctcctttttcattacaactattctttccgggttactgtttcgatcagggcgag
 R N S P F S L Q L F F P G Y C F D Q A Q
 V I L L F H Y N Y S F R V T V S I R R R
 * F S F F I T T I L S G L L F R S G A G
gcatgggtggggttctgcctggccttttcaatgagtggttatcacgggttctccttctt
 A W W G F C L A F S M S G Y H G F S F L
 H G G V S A W P F Q * V V I T G S P S F
 M V G F L P G L F N E W L S R V L L P F
tttgaaaaggaggagtcctcgaaaacaaaaattagatctttggtatcacggttctatcca
 F E K E E S S K T K N * I F V I Q F Y P
 L K R R S P R K Q K I R S L L Y S S I H
 * K G G V L E N K K L D L C Y T V L S I
tttggtttcttgggtggtatgttgcctctgagagctctattttggtatgtgggtttt
 F V F L V V D I L H L E S S I L V C G F
 L F F L L W I F C I W R A L F W Y V F F
 C F S C C G Y F F A S G E L Y F G M W F S
ctcactttttaccactcgttttgggtggggacgctagagtttggggttggtgcaggtt
 L T F Y H S F C V W G R * S L G L V Q V
 S L F T T R F V C G D A R V W G W C R L
 H F L P L V L C V G T L E F G V G A G *

```

agcctgctccaacccaacatgctaaatcttgaaagggatgccgaatctggaggctact
S L L Q P Q H A K S W K G M P N L E A T
A C S N P N M L N L G K G C R I W R L L
P A P T P T C * I L E R D A E S G G Y F
tttgaaacattagtggtatgcatttgtgtttttggacaagaacaaggatgggtatgtgagc
F E T L V D A F V F L D K N K D G Y V S
L K H * W M H L C F W T R T R M G M * A
* N I S G C I C V F G Q E Q G W V C E Q
aaaaacgagatggttgatgctataaatgaaactacttctggagaacgatcttctggaaga
K N E M V D A I N E T T S G E R S S G R
K T R W L M L * M K L L L E N D L L E E
K R D G * C Y K * N Y F W R T I F W K N
attgccatgaggagattcgaagagatggactgggacaagaatggcatggatgaacttcaag
I A M R R F E E M D W D K N G M V N F K
L P * G D S K R W T G T R M A W * T S R
C H E E I R R D G L G Q E W H G E L Q G
gagttcctttttgctttcactcgttgggttggcattgaagacgccgatgacgagga
E F L F A F T R W V G I E D A D D E X
S S F L L S L V G L A L K T P M T R X
V P F C F H S L G W H * R R R * R G

```

6.1.2.1: Vergleich der Sequenzen RAS-1.1 und der über RACE-PCR erhaltenen Sequenz RAS-3

Der ausgehend von der Sequenz des RAS-1.1 Klones ausgewählte genspezifische Primer GSP-1 ist unterstrichen. Homologien der beiden Klone sind grau hinterlegt.

```

RAS3: -----
RAS11:MCACAMAAACGRTGTAAAAGKARAACCACATMCCAAATAGASYCTCCAGTGCAAATWTCCCC

```

```

RAS3: -----
RAS11:ACAAGAAAACAAATGATAGACTGTATAACAAGATCTAATTTTTTKTTTTTCGAGACTCCTCCT

```

```

RAS3: -----KGGCAGAAACCCCA
RAS11:TTTCAAAAAGGAAGGAGAACCCGTGATAACCACTACATTGAAAAGGCCAGGCAGAAACCCCA

```

```

RAS3: CCATGCCTGCGCCTGACCGCTGAAGGTGSAGCAGGTGCTGGCCAGCGCCCGGAGCATCCTGG
RAS11:CCATGCCTGCGCCTGATCGAAACAGTAACCCGGAAAGAAATAGTTGTAATGAAAAGGAGAAAT

```

```

RAS3: CGCAACTGAAGGTGCTGGAGGATCGGCTCTCGCCTCACAACGCCCGTTTCGCATCCGCCTG
RAS11:TACGTATCGAATCGAAGGAGGACAAATCCAAAAGAAAGGCCAGAAGAGAAGGATAAAAAAAG

```

```

RAS3: CATGTGTCGCTGGCGGTGCGCTGGCTGCTGCCAAGCTCAGTGATTCTATCGCAACCATCC
RAS11:GAATGTA AAAAGGGGCGAGGACTCCTTTAGAAGGAGAGTACTTAATAGTATACAAAAAAG

```

```

RAS3: CGATATTTCCCTGGCGATCGAGACCGTCCACCGAGGTGGTCGAGCCGGCGAGTKACAGCG
RAS11:AAAAAAGGCCTTAGGCTAGCATAAAAGTCTTTTGAATATAAAAGACACAAGGATTGGGCTA

```

```

RAS3: ATGCCTACATCCTTTACCTGCCAAACCCGACAACGATCTGCGCGCCTGACCTTGTTCAC
RAS11:AAACCCGAACGGAATTTTAACCAAATCAAATCAATGCATCAAGAACACACAAAATAAGA

```

```

RAS3: GAGTCATTGGTGCCGGTCTGCGCACCGGGTTTGGGGCCACTGGCTTCGGTGGAGCAACTCGC
RAS11:AAGAAGAAAGGGTAATTATTTTCATATAGTCTAATGTACACCCGAGGTCAAGAAAAGACTTTG

```

```

RAS3: AACTTTGCGCTGCTGCATCGTTCCGGCCGACAAGCAAGACTGGATGACCTGGCTGGCGGCCA
RAS11:TTTGCTCTCAACCAAAGGTTGATTTCAAATCCCTTTCTTGGTGGTTACCGAGATCCTTTCT

```

```

RAS3: ATGGTGC GCGGTGCTGGACGACTACCGGCATATCCCGTTCAACCTCGACGAACTGGCACTG
RAS11:TCAAGAGCGATCGAATTCGCATTTCTTTATTTAAGAGAAAAGTTGACGTTGAATTTCTGTC

```


RAS3: GATGCCGCCGCCGCGGGCTTGGGGTGGCGATGACGGACCTGACCCTGGCGGCCGARTCGAT
 RAS11: GAGAAGAAATGATGGCAAGTGAGCGAGTGGTAGAAGCAGGAGCAACTGGTCTTTGATTGAGA

RAS3: CGAACGGGGTGTGTTGGTGGTGGCGTTTGGTCAGCCGCTGGTGACC GGCGGGGTGTATGCAT
 RAS11: CGCTCGGCCCAAAGAGGCCTTCTTGAATCTGTATTTCTTCTTTCTCTTACTCGTTCAGGG

RAS3: TGTGCTTGCAGCCATCGGGCGTCAACCCAGGCTGTGCGCTGATCATGCAGTGGTTTGGG
 RAS11: GCTCAAGCTTTCGCTTTCCTCAACGGGATTTGAAGTCCCAATCCTACACGGCGCCTAAGAC

RAS3: CAGCAGGCGCGGCATGCTAACGTCACGCCTTAACTTACTATCGCCAGTTCATCCATGAAAAT
 RAS11: CTAGAATGAATAATCGGAAGGGTGTCTTGGTTGGACTGATAGCAAGGGCCATAGACCATC

RAS3: GCCCGATATCGACGCCATCCAGGCGTTCGTCCTGGTCGCTGAACCTCAAGARTTTCACCCGCG
 RAS11: CTCCGATGGTTGCTAATCAAATCACTCTTGAAAGCTATTGAGATAGAAGCAGGTGTCCGCTT

RAS3: CCGCCGATGCCATCGGGSAMCTCAGGCGGCCATCARCCTGAAGATAAAACGCCTCGAAGAAA
 RAS11: GATGCTCATTGAGGATTACAAATGGAGTAGGGGCAGGCTA

RAS3: GCCTTGGCCGAAGCTGCTGGAGCGCACGCCGAGACGGGTACGTTGTGGCCCATGGGCAG
 RAS11: -----

RAS3: ATGTTTTTGGCCAGCGCGCGCGTGGTGGTGGACAACCTACCAGGAGCGGATGAACTGTTTTTG
 RAS11: -----

RAS3: CCCGAGAAACGCACCTTGGCGGTGGGCGTCAGCCACCACATTGTCCGGCGCGATCTCACCT
 : 1068
 RAS11: -----

RAS3: GTGGCTGCGGCGTTTGGCGACCACCGACCCGACGTGATCGTGGCGTTCAGCCTCGGCACCT
 RAS11: -----

RAS3: CGCGGGACATGTCGATGAACTACGAGCAGGGCAAGCTGGATGTGGCGATGATCTGCGGCACG
 RAS11: -----

RAS3: ACAACCGTCGCCAGGACGGCGAAGTGGTGGGCGTCGAACGCTTTGGCTGGATGGCTTCCAC
 RAS11: -----

RAS3: GACTTCGAATTACGCCAGGGGCGGGCGTTGCCCTGGCGATCCAGCCGGAACCCTGCGGCAT
 RAS11: -----

RAS3: GCGCAGCATGGTGATGGCGGCGCTGGCCGAACAGAACTTCGCTGGGAAGAGGCGTTCGTGG
 RAS11: -----

RAS3: GCAGCGGGATTCTGGCGATTGGTGCTGCGGTGGTGGCGGGGATTGGCATCGGC CGGATGGTG
 RAS11: -----

RAS3: GGGCGGATGGCGCCTGGTGGCTGCGTCGACGTGGAGCAGCGTTTCGACCTGCCGCCGCTGCC
 RAS11: -----

RAS3: CAGTCGTGAAGTGGTGTGTATACGGCGCAGCGGGACACTCAGGCGCAGGCATGGTGGGGTY
 RAS11: -----

RAS3: TCTSCCA
 RAS11: -----

6.1.3: Sequenzen verschiedener 4CL-Klone

Vergleich verschiedener DNA-Sequenzen bekannter 4CL-Klone. Homologien sind grau unterlegt.

Ory = *Oryza sativa*, Ara = *Arabidopsis thaliana*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Sol = *Solanum tuberosum*, Pet = *Petroselinum crispum*

Nic: -----TTCCTTTTAGCGTGTTC
Sol: CTCATATATATATTCATCAATCTTGCACATTCATCTTCAGGA CACCATAGCTAAAAATC

Ory: TGCTCCGGCCATGATCACGGTGGCGGCACCGGAG-GCGCAGC--CGCAGG--TGCGGGCG
Ara: -----TTACAATGGCGCCACAAGAACAAGCAGTTTCTCAGG--TGATGG-A
Nic: CTTTTTCTCTTTTGTCTCTCTAAATCTACTTAAA-CCATAGC--CACAA---TGCCAATG
Sol: TACTTTTCTTTTAGCTTTTCAGTGTGCTCCA AATTTTTTCCTTTTTTAGCTCTCAAGATG

Ory: GCGGTCGATGAGGCGCGCCGGAGGC-GGTGACG--GTGTTCCGGTCCAAGCTTCCGGGAC
Ara: GA----AACAGAGCAACAACAACAAC-AGTGACGTCATTTCCGATCAAAGTTACCGGAT
Nic: GAGACTACTACAGAAACAAGCAATCAGGAGATTTAATTTCCGATCAAACTCCCTGAT
Sol: CCGATGGATACCGAAACAAGCAATCAGGAGATTTAATCTTTCGATCTAAACTCCCTGAT

Ory: ATCGACATCCCAGCCACCTGCCCTGCACGAGTACTGCTTCGCCAGGGCGGCCGAGCTC
Ara: ATTTACATCCC GAACCACCTATCTCTCCACGACTACATCTTCCAAAACATCTCCGAATTC
Nic: ATTTACATCCC TAAACATTTACCTTTACATTCTTATTTGTTTTGAAAAACATTTCCGGAGTTT
Sol: ATTTACATCCC TAAACATTTGCCTTTACATTCTTATTGCTTTGAAAATCTATCGGAGTTT

Ory: CCCGACGGCCGTCGCTCATCGCGCGGCCACGGGGAGGAGCTACACGTTCCGCCGAGACG
Ara: GCCACTAAGCCTTGCCCTAATCAACGGACCAACCGGCCACGTTACACTTACTCCGACGTC
Nic: AGTTCTCGTCCCTGTTTGATTAATGGAGCCAACGATCAAATTTATACTTATGCTGAGGTT
Sol: AATTCCCGGCCCTGTTTGATTGATGGTGCAAATGATCGAATCTATACTTATGCTGAAGTT

Ory: CGCCTGCTGTGCCGAGGGCCGCGCGCGCTGCACCGGCTGGGCGTCGGCCACGGCGAC
Ara: CACGTCATCTCCCGCAAATCGCGCCAATTTTTCACAACTCGGCGTTAACAAAAACGAC
Nic: GAGCTCACTTGACAGAAAAGTTGCAGTTGGTCTTAACAAGTTAGGGATCCAACAAAAGGAC
Sol: GAACTTACTTCGAGAAAAGTTGCTGTTGGTCTTAACA AATTTGGGGATCCAACAGAAGGAT
Pet: -----TCAAA TAAAAATCCACATTGAATAA

Ory: CGCGTCATGGTGCTGCTCCAGAACTGCGTGAGGTTCCGCGTGCGGTTCTTCGCCGCGTCG
Ara: GTCGTCATGCTCCTCCTCCCAAACCTGTCGCGAATTCGTCCTCTCTTTTCTCGCCGCTCC
Nic: ACGATTATGATCCTTTTGC CGAATCCCCTGAATTTGTGTTTGTCTTTATGGGCGCTTCA
Sol: ACAATCATGATCCTTTTGCCTAATGCGCCTGAATTTGTGTTTGGGTTTATTGGCGCATCG
Pet: ATGAGCA--ATGAGTTTGGGTGCTGCACT--ACCTGTATTTTTTTAAATTTGTTATTTT

Ory: TTCTCGGCGCGGTACCACCGCCGCCAACCCGTTCTGCAAGCCGAGGATCCACAAG
Ara: TTCCGCGCGCAACCGCCACCGCCGCAAACCCCTTTCTTCACTCCGGCGGAGATAGCTAAA
Nic: TATTTAGGAGCCATTTCTACAATGGCCAATCCTCTGTTTACACCTGCAGAGGTTGTAAAA
Sol: TATCTAGGAGCAATTTCAACAATGGCTAACCCCTGTTTACACCAGCAGAGGTAGTAAAG
Pet: AATTAAGTACCACCTAATATTAATGGGGACGGATACCTGTTA--GGTAAAATTAT-GTG

Ory: CAGTTCAAGGGCTCCGGCGTGAAGCTCATCTCACCCAGTCCGTCACGTCGACAAGCTC
Ara: CAAGCCAAAGCCTC CAACACCAAACCTCATAATCACC GAAGCTCGTTACGTCGACAAAATC
Nic: CAAGCCAAAGCCTCAAGTGCTAAGATTATTATACTCAATCGTGCTTTGTGGGCAAAGTG
Sol: CAAGCCAAAGCCTCAAGTGCTAAGATTATTATCACGCAAGCTTGTTTTGGGGGAAAGTG
Pet: TAATCCAAA-CGTCGCTAGCTAAA--TACTCAAATTAGACCAAGGTTTTAAAACCTAAATT

Ory: CGGCAGCACGAGGCGTTCCCAAGGATCGACGCCTGCACCGTCGGCGACGACACGCTCACC
Ara: AAACCACTTCAAAAACGACGACGGAGTAGTCATCGTCTGCATCGACGACAACGAATCCGTTG
Nic: AAGGATTACGCAAGTGAAAATGATGTGAAGGTCATTTGTATTTG---AC-----TCTGCA
Sol: AAGGATTACGCAATTTGAAAATGATTTGAAGGTAATATGCGTCG---AT-----TCAGCA
Pet: AAGTAG-ATATAATCAATTTTTGATTTTAAATACAGTTAT-TCG---AT-----TTTTAAA

Ory: GTGATCACCATCGACGACGACGAGGCGACGCCGAAGCGTGCCTGCCGTTCTGGGACCTG
 Ara: CCAATCCCTGAAGGCTGCCTCC--GCTTCACCGA-----GTTGACTCAG---TCG
 Nic: CCG-----GAAGGTTGTCTTC--ATTTCTCAGA-----ATTGACACAA-----T
 Sol: CCG-----GAAGGTTGTGTTTC--ATTTCTCCGA-----ATTGATTCAAT-----
 Pet: TTTAT----GCAAGTTCTCCTAAAACCTGAGATAATATC----TTACTACTAAA-----T

Ory: ATCGCGGACGCCGACGAGGGTCCGTTCCCGGAGGTGGCCATCTCGCCGGACGACCCCGT
 Ara: ACAACCGAGGCATCAGAAGTCATCGACTCG---GTGGAGATTTACCGGACGACGTTGGTG
 Nic: ----CCGATGAGCATGAAATTCCTGA---G---GTGAAAATCCAGCCAGACGACGTCGTT
 Sol: ----CCGACGAACACGAAATTCCTGAT-----GTGAAAATCCAGCCGGACGATGTCGTA
 Pet: CTACTATATGTTATGGATATACTTTAT-----ATGAATATTTAAGGAAATATTTTATCT

Ory: GCGCTGCC--GTTCCTCGTGGGACGACGGGGCTTGCCAGGGCGTGGTGCTGACGCACA
 Ara: GCACTACC--TTACTCCTCTGGCAGCAGGGATTACCAAAAGGAGTGATGCTGACTCACA
 Nic: GCGCTGCC--GTATTCCTCTGGTACTACAGGGCTGCCGAAAGGTGTGATGTTGACGCACA
 Sol: GCGCTGCC--GTATTCCTCCGGACTACCGGGCTGCCGAAAGGGGTGATGTTGACACACA
 Pet: GAAGTTTTAAGAATTTGTTTTAAATTTTAAAAAATTCAAAATACTTCTTCCAGATTT-CA

Ory: GGAGCGTTCGTGTC--GGGCGTGGCGCACGAGGTGGACGGCGAGAACC CGAACCTGCACAT
 Ara: AGGGACTAGTCAC--GAGCGTTGCTCAGCAAGTCGACGGCGAGAACC CGAATCTTTATTT
 Nic: AGGGATTAGTCAC--GAGCGTTGCACAACAAGTTGACGGTGAAAATGCGAATTTGTATAT
 Sol: AAGGATTAGTAAC--AAGCGTTGCACAACAAGTTGATGGAGAAAATGCTAATTTGTATAT
 Pet: AATAATCAATTATTAATAACATGATAATATTAATATTAATAAGTTTTTCAATTCCTGAT

Ory: GGGTGCCGGCGACGTGGCGCTGTGCGTGTGCGGCTGTTCCACATCTTCTCGCTCAACTC
 Ara: CCACAGCGATGACGTCATACTCTGTGTTTTGCCCATGTTTCATATCTACGCTTTGAACTC
 Nic: GCACAGTGAGGATGTATTGATGTGTGTTGCGCTTTGTTCCATATATACTCACTCAATTC
 Sol: GCACAGCGATGATGTGTTGATGTGTGTTGCGCTTTGTTCCATATTTACTCACTCAATTC
 Pet: GTATCTCATCAAAATACCCAGATCTCGAGGATGACTTTAGATATACTTTAGCATACCAA

Ory: CGTGCTGCTGT-CGCGGGTGGCGCCGGCGCGCGGGCGGTGGCGCTGATGCCAGGTTTCGAGA
 Ara: GATCATGTTGTGTGGTCTTAGAGTTGGTGC-GGCGATTCTGATAATGCCGAAGTTTGAGA
 Nic: CATTTTGCTTTGTGGATTGAGAGTCGGTGC-AGCGATTTTGATTATGCAGAAATTTGACA
 Sol: TGTTTTGCTCTGTGCATTGAGAGTCGGAGC-AGCAATTTTGATTATGCAGAAATTCGACA
 Pet: GATTTCAAAAAGTTTTCCAATTTCTTTATCAAAACTCACAGATTTTACAAATTCAGA

Ory: TGGGCGCCATGCTGGGGGCCATCGAGCGGTGGCGCTGACGGTCCGGGCGCTCGTGCCGC
 Ara: TCAATCTGCTATTGGAGCTGATCCAGAGGTGTAAGTGACGGTGGCTCCGATGGTTCGCG
 Nic: TTGCTCCGTTCTTGGAGTTAATACAGAAGTATAAGGTGTCAATTGGGCCATTTGTGCCGC
 Sol: TTGCTCAGTTTTTAGAGTTGATACCGAAGCATAAAGTGACAATTGGACCATTTGTTCCGC
 Pet: TTCTTCAAAAATATAGAAATAAAAGAATTAGATAAAAT----ATGATGCTATTTAATATTA

Ory: CGCTCGTTCGTCGCTCGCCAAGAACCCTCGTTCGTGGAGCGCCACGACCTCAGCTCCATCC
 Ara: CGATTGTGTTGGCCATTGCGAAGTCTTCGGAGACGGAGAAGTATGATTTGAGCTCGATAA
 Nic: CTATTGTTCTGGCTATTGCTAAGAGTCCAATTGTTGATAGCTATGATCTTTCTCAGTAA
 Sol: CTATTGTTCTCGCCATTGCTAAGAGTCCATTAGTTTCATAACTACGATCTTTCATCAGTAA
 Pet: CTAATTTGTTTTTTTTAATCTAGCTTGGTTTATCAGAATCAAATAAGCCAGACTCTTAA

Ory: GCATCGTTCGCTCTCCGGCGCCGCCCGCTCGGCAAGGAGCTCGAGGACGCCCTCCGCGCC
 Ara: GAGTGGTGAAATCTGGTGTCTCCTCTTGGTAAAGAACTGAAGATGCCGTTAATGCCA
 Nic: GGACTGTCATGTCTGGGGCTGCACCATTAGGAAAAGAACTCGAAGACGCTGTGAGAACCA
 Sol: GAACAGTCATGTCTGGTGTCTGCACCATTAGGAAAGGAACTTGAAGATGCCGTTCCGAGCAA
 Pet: GGATAATCAAAAATATTAATGTGATAT----ACCAAGATTCAAAAAAGTT-TT----CGA

Ory: GCCTGCCTCAGGCCATCTTCCGACAGGGATACGGGATGACGGAG---GCGGGGCCGGTGC
 Ara: AGTTTCCCTAATGCCAAACTCGGTACAGGGATACGGAATGACGGAA---GCAGGTCCAGTGC
 Nic: AATTCCCTAACGCTAAACTTGGCCAGGGTTATGGAATGACGGAA---GCTGGGCCGGTGT
 Sol: AATTCCCTAACGCTAAACTCGGTACAGGTAATAATTTTCTATTGCGCGGAGTTAGAAT
 Pet: AATCC----ATATCAAAATACTTACAGATATTTATAAATTTTGAAA-----AATCTATAT

Ory: TGTCGATGTGCCCGCGTTTCGCCAAGGA-GCCGACGCCGGCGAAGTCCGGGTCGTGCGGG
 Ara: TAGCAATGTCGTTAGGTTTTGCAAAGGA-ACCTTTTCCGGTTAAGTCAGGAGCTTGTGGT
 Nic: TGGCAATGTGTTTGGCATTTCGAAAAGA-ACCCTTTGATATTAATCAGGGGCATGTGGT
 Sol: T--TAAATTTATTACTATTTACCCATA-AATATAAGGTAT-ACGTTAAAGTTAT-TGAT
 Pet: TA--AATATGTCAGATTTTCAAAAATAAATAAAATCCGAAATGAATTTAAAGAAAA----T

Ory: ACGGTGGTGCGGAACGCGGAGCTCAAGGTG-GTCGACCCGGACACGGGCTTCTCCCTCGG
 Ara: ACTGTTGTAAGAAATGCTGAGATGAAAATA-GTTGATCCAGACACCGGAGATTCTCTTTC
 Nic: ACTGTTGTGAGGAACGCCGAGATGAAAATT-GTAGATCCGGATACGGGTTGCTCTCTTCC
 Sol: CTTTATCTTCATGTTCTTATCTGAAATACATCCATGTGCTGATGCGCTAGTTTCGCAA
 Pet: GCCGTCCTATATAATTTGTGAGTTGGTAAAT--CT--CGCATCACATGCTGCTTCATCTT

Ory: CCGCAACTCCC CGGCAGAT ---CTGCATCCGCGGCCACAGATCATGAAAGGTTACCT
 Ara: GAGGAATCAACCCGGTGAGAT ---TTGTATTTCGTGGTCACCAGATCATGAAAGGTTACCT
 Nic: TCGTAACCAACCCGGTGAGAT ---TTGCATTAGAGGTGACCAGATCATGAAAGGTTACCT
 Sol: AAACAATATTTTTAA-GAGATACACTGAAACCAAAAAATTTAATTTTAAATTACACGTTA
 Pet: AGTCAACTTTTTCCCTTCATC--ACCTAACACACAATATTTTTCTCACCAACCCCACTCA

Ory: GAAC---GATCCCGAGGCGACCGCCGCGACGATCGACGTCGAGGGTGGCTGCACACCGG
 Ara: CAAC---AATCCGGCAGCTACAGCAGAGACCATTGATAAAGACGGTTGGCTTCATACTGG
 Nic: GAAT---GATCCCGAGGCCACAACGAGAACAATAGACAAAGAAGGATGGTTACACACTGG
 Sol: TAGT---TTTCCTAATTTTGGAGTTACAAATGT-ATTTTGCTTGACTAAGTAAATATTGT
 Pet: TAATTTAATTCCCATTTTACCCCTAACCAAAC-CTCATATTCGGATAAACTCCCCCTTT

Ory: CAACATCGGCTACGTCGACGACGACGACGAGGTCTTCATCGTCGACCGTGTCAAGGAGCT
 Ara: AGATATTGGATTGATCGATGACGATGACGAGCTTTTCATCGTTGATCGATTGAAAGAACT
 Nic: CGACATTGGGTTCAATTGACGAGGATGACGAGCTTTTCATTGTGGATCGATTGAAGGAATT
 Sol: AGCCAAACGTCGTGTTT--TTAAAAAATGTGCACAAGAATACTGCACGCCTTTGTGGAC-
 Pet: ACCAACCCCATCCCC-----TTACCAAACCTCCA-CATTTATATGTTGAATTGTTT

Ory: CATCAAATTCAGGGGTTCCAGGTGCCGCCGCGGAGCTGGAGTCGCTGCTCATCGTCA
 Ara: TATCAAGTATAAAGGTTTTCCAGGTAGCTCCGGCTGAGCTAGAGGCTTTGCTCATCGGTCA
 Nic: GATCAAAACAAAGGATTTCAAGTGGCACCTGCAGAAATTGAAGCCCTTCTTCTCAACCA
 Sol: -ATTGATTTGACTTTTAAACAA-TACATTTGCCCTTATTATGGTTTCTTGATAGTACTA
 Pet: -ATCA--TCTAACATGTAAGAACTCTCTTACTC-ATCATCGTTTCAACACCAAAAAACA

Ory: CCCGTCCATCCGTGACGCCGCCGTTCGTCGCCGAAAAGGATGACGTCGCCGGCGAGGTCCC
 Ara: TCCTGACATTACTGATGTTGCTGTTGTGCGCAATGAAAGAAGAAGCAGCTGGTGAAGTTCC
 Nic: TCCCAACATTTCTGATGCTGCTGTTGTCCCATGAAAGATGAGCAAGCAGGAGAAGTTCC
 Sol: GCCAGCCAGGATACACTGTATTTATTTTATTATTGTTGAATAAATTTCCAAATTTAAATTT
 Pet: CACACACAACAAACATTTTCAATTTCTCATTATGGGAGATTGTGTAGCACCCAAA-----

Ory: GGTCGCGTTCGTGGTCCGCGCCGCGACTCCGACATCACGGAGGAGTCCATCAAGGAATT
 Ara: TGTTGCATTTGTGGTGAATCGAAGGATTCGGAGTTATCAGAAGATGATGTGAAGCAATT
 Nic: AGTGGCTTTTGTGTTAGGTCAAATGGATCTGCCATCACTGAGGATGAAGTCAAGGATTT
 Sol: ATTGAC--TAATTAATAAATTATTAATTTAAATA----GGTTATGGAATGACGGGAAGC

Ory: CATATCCAAGCAGGTGGTGTTCACAAGAGGCTACACAAGGTGCACATTCATCCATGC-GA
 Ara: CGTGTCGAAAACAGGTTGTGTTTTACAAGAGAATCAACAAAGTGTTCCTCACTGAATC-CA
 Nic: CATCTCTAAACAGGTGATATTTTATAAGAGAGTAAAGCGTGTATTTTTCGTGGAGAC-GG
 Sol: CCGTACTGTGCTGACGATGTGTTTGGCATTTCGCGAAAGAACCGTTTGATATTAATCAGG

Ory: TCCCAAGTCGGCGTCTGGGAAGATACTGAGGAGAGAGCTCAGAGCCAAGCTCGCGG---
 Ara: TTCTTAAAGCTCCATCAGGGAAGATATTGAGGAAAGATCTGAGGGCAAAACTAGCAAATG
 Nic: TACCCAAATCTCCGTCGGGAAAAATCTTAGAAAGGACTTGAGAGCTAGACTGGCTGCTG
 Sol: GGCATGTGGTACTGTTGTGAGGAAACGCGGAGATGAAAATTGTGGATCCGGATACGGGTTG

Ory: -----CGTGCTG-ACCATGTCAATGATGGA--TAATGATGGCT-----AGG
 Ara: GA-----TTGTGATGGATGATTTCAACCAAAAAG-CAAAGATGATTTT-----AAT
 Nic: GT-----GTCCAAATTAATTCCTTTTGGCTTGGTATTTGATGGTGGTAAC-----AAA
 Sol: CTCTCTGCCCCGTAACCAACCCGTTGAAATTTGCAT-TAGAGGTGATCAAATCATGAAAG

Ory: CTATACATGCGTTCTACT-----ATGTATT---ACTCTGAAAATGCAGT-----GAAG
Ara: GTGTATATACATACTACT-----GTTTGACCCAACCAAGGAAACAAACTCATACT--GAAC
Nic: CTAAACAAGTCCACCATTGA-AGATATTATATGTTCTTTAAATTTTACCTTCACCTAACG
Sol: GTATGTTAAAATCTTCTTAATATTTATGACTTTTGCCTGGAATATGTATTCTT-CGTAAAG

Ory: TTCTGGTTGAT-TTGTGGTCGTATTTG---T-GACGAGATTTATTTCTGAGAAAAAAA
Ara: CATTGTCTTTTGTGTTGTTGTTGTTG---TTGTTGTTGCTGTTCTTGCTTGATTCATGT
Nic: GTATAATTTCCAGTTTGGCAACGGCGAAAATGTCTGTAAATTAATTTATAAGACTTCTTT
Sol: TTAAGTTACGTGTCAAATTAGTATTTTAGTTAGGTGACCATTTACATATATTTCAAAAAT

Ory: GTTTATTCTTTTGCT-----
Ara: AATGAGCCTTTGTGATGAAGGTGGTTTCTTT-----
Nic: ATTCATCTTTAAAAAAAAAAAAAAAA-----
Sol: ACACGTTTATTAGGAACATACGTATATAGATAATAACACAGTTTGTTAAGAATAATAA

6.2: Literaturverzeichnis

- Becker-Andre M., Schulze-Lefert p., Hahlbrock K. (1991)**
Structural comparison, modes of expression, and putative cis-acting elements of the two 4-coumarate:CoA ligase genes in potato. *J. Biol. Chem.* 266 (13): 8551 - 8559
- Benson E. E. (1994)**
Cryopreservation. *Plant Cell Culture: A Practical Approach* (R. A. Dixon, R.A. Gonzales, Ed.), 2nd ed., pp. 147-167. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Berlin J. (1986)**
Secondary products from plant cell cultures. *Biotechnology*, Vol. 4, Microbial Products II, Pape H., Rehm H. J. (Hrsg.), pp: 629 - 658 VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Birnboim H. C., Doly J. (1979)**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513 - 2246
- Blum H., Beier H., Gross H. J. (1987)**
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93 – 99
- Bradford M. M. (1976)**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 - 254
- Carle R. (1992)**
Phytoalexine und ihre Bedeutung für die Resistenz höherer Pflanzen gegenüber Schadorganismen. *Pharmazie in unserer Zeit* 21: 99 - 104
- Chaprin N., Ellis B. E. (1984)**
Microspectrophotometric evaluation of rosmarinic acid accumulation in single cultured plant cells. *Can. J. Bot.* 62: 2278 - 2282
- Chen J.T., Chang C., Chang W.C. (1999)**
Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Reports* 19: 143-149
- Compton S. J., Jones C. G. (1985)**
Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 151: 369-374
- Cooper T. G. (1981)**
Biochemische Arbeitsmethoden. Verlag de Gruyter, Berlin.
- De-Eknamkul W., Ellis B. E. (1988)**
Rosmarinic acid: Production in plant cell cultures. *Bajaj YPS (Hrsg.), pp: 310 - 329* *Biotechnology in Agriculture and Forestry Band 4, Medicinal and Aromatic Plants I.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- De-Eknamkul W., Ellis B. E. (1987)**
Tyrosine aminotransferase: the entrypoint enzyme of the tyrosine-derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 26: 1941 - 1946
- De Luca V., St. Pierre B., (2000)**
The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science* 5: 168 - 173

- Denis J. N., Greene A. E., Guenard D., Gueritte - Voegelien F., Mangatal L., Potier P. (1988)**
A highly efficient, practical approach to natural taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 5917 - 5919
- Doerk-Schmitz K. (1993)**
Untersuchungen zur Tropanalkaloidbiosynthese in Pflanzen und transformierten Wurzelkulturen von *Hyoscyamus albus*. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Douglas C., Hoffmann H., Schulz W., Hahlbrock K. (1987)**
Structure and elicitor or u.v.-light-stimulated expression of 4-coumarate:CoA ligase genes in parsley. *EMBO J.* 6: 1189-1195
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1990)**
Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Gibco BRL Focus* 12 Number 1
- Dutta D., Hadd H., Vander Velde D. G., Georg G. I. (1999)**
A One-Step Synthesis of a Deuterated Paclitaxel Analogue: 10-Deacetoxy-(10 α -²H)Paclitaxel. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9: 3277 - 3278
- Edelman M. J., Gandara D. R. (1996)**
Promising new agents in the treatment of non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 37: 385-393
- Ellis B. E., Towers G. H. N. (1970)**
Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem. J.* 118: 291 - 297
- Engelberger W., Hadding U., Etschenberg E., Graf E., Leyck S., Winkelmann J., Parnham M. J. (1988)**
Rosmarinic acid: A new inhibitor of complement C3 convertase with anti-inflammatory activity. *Int. J. Immunopharmacol.* 10: 729 - 737
- Farrar J., Pollock C., Gallagher J. (2000)**
Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154: 1-11
- Fisher, Long (1992)**
Rhizobium - plant signal exchange. *Nature* 357: 655
- Francisco A.A., Gawlak S.L., Miller M., Bathe J., Russel D., Chace D., Mixan B., Zhao L., Fell H.P., Siegall C.B. (1997)**
Expression and characterization of Bryodin 1 and a Bryodin 1-based single chain immunotoxin from tobacco cell culture. *Bioconjugate Chem.* 8: 708 - 713
- Freytag S., Hahlbrock K. (1992)**
Abwehrreaktionen von Pflanzen gegen Pilzbefall. *Biologie in unserer Zeit* 22: 135-142
- Fritzmeier K. H., Cretin C., Kombrink E., Rohwer F., Taylor J., Scheel D., Hahlbrock K. (1987)**
Transient induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase and 4-Coumarate:CoA Ligase mRNAs in Potato Leaves Infected with Virulent or Avirulent Races of *Phytophthora infestans*. *Plant physiol.* 85: 34-41
- Fu T.J., Singh G., Curtis W.R. (Ed.) (1999)**
Plant Cell Culture for the Production of Food ingredients produced by plant cell and tissue culture. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishing.
- Fujita Y., Tabata M., Nishi A., Yamada Y. (1982)**
New medium and production of secondary compounds with the two-staged culture method. *Plant Tissue Culture*, A. Fujiwara (Hrsg.), pp: 399 - 400 Maruzen Co, Tokyo
- Gertlowski C. (1991)**
Einfluss des Kulturmediums auf die Produktion von Rosmarinsäure in Suspensionskulturen von *Coleus blumei*. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.

Gertlowski C., Petersen M. (1993)

Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Tissue Org. Cult. 34: 183 - 190

Gibson S. I. (2000)

Plant Sugar-Response Pathways. Part of a Complex Regulatory Web. Plant physiology 124: 1532-1539

Glaßgen W.E., Komossa D., Bohnenkamper O., Haas M, Hertkorn N., May R.G., Szymczak W., Sandermann H. Jr. (1999)

Metabolism of the Herbicide Isoproturon in Wheat and Soybean Cell Suspension Cultures. Pesticide Biochemistry and Physiology 63: 97 - 113

Goldstein W.E. (1999)

Economic considerations for food ingredients produced by plant cell and tissue culture. Plant Cell Culture for the production of Food Ingredients. Fu T.J., Singh G, Curtis W. R. (Eds.), pp: 195 - 213, Kluwer Academic / Plenum Publishing, New York.

Grüne H., Westhoff P (1988)

Transfer von RNA auf Pall Biodyne A Nylonmembranen und Immobilisierung durch UV-Crosslinking. Pall Bio Support SD 1217 G

Hahlbrock K. (1986)

Secondary products. Silver S. (Hrsg.) Biotechnology: Potentials and Limitations, Dahlem Konferenzen pp: 241 - 257

Hanahan D.(1985)

Techniques for transformation of *E. coli*. Glover DM (Eds.), pp: 109 - 135 DNA Cloning Vol 1. IRL Press, Oxford - Washington

Harborne J. B. (1995)

Ökologische Biochemie - eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag , Heidelberg, Berlin, Oxford

Harding S. A., Oh S. H., Roberts D. M. (1997)

Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. EMBO J. 16: 1137-1144

Häusler E. (1989)

Charakterisierung der Hydroxyphenylpyruvatreduktase aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei*. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.

Häusler E., Petersen M. (1993)

Isolation of protoplasts and vacuoles from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. Plant Cell Rep. 12: 510-512

Häusler E., Petersen M., Alfermann A. W. (1992)

Rosmarinsäure in *Blechnum* Spezies. In: Botanikertagung 1992 Berlin , Haschke, H. P., Schnarrenberger C. (Hrsg.), p 507, Akademie Verlag Berlin

Herbers K., Meuwly P., Metraux J. P., Sonnewald U. (1996)

Salicylic acid independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. FEBS Letters 397: 239-244

Herdeg C., Oberhoff M., Siegel - Axel D. I., Baumbach A., Blattner A., Küttner A., Schröder S., Karsch K. R. (2000)

Paclitaxel: Ein Chemotherapeutikum zur Restenoseprophylaxe. Experimentelle Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*. Z. Kardiologie. 89: 390 - 397

Hippolyte I., Marin B., Baccou J. C., Jonard R. (1992)

Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. Plant Cell Rep. 11: 109 - 112

- Hohlfeld H., Schürmann W., Scheel D., Strack D. (1995)**
 Partial Purification and characterization of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:Tyramine Hydroxycinnamoyltransferase from Cell Suspension Cultures of *Solanum tuberosum*. *Plant physiol.* 107: 545-552
- Hohlfeld H., Scheel D., Strack D. (1996)**
 Purification of Hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell-suspension cultures of *solanum tuberosum* L. cv. *Datura*. *Planta* 199: 166-168
- Holton R. A., Somoza C., Kim H-B., Liang F., Biediger J., Boatman P. D., Shindu M., Smith C. C., Kim S., Nadizadeh H., Suzuki Y., Tao C., Vu P., Tang S., Zhang P., Murthi K. K., Gentile L. N., Liu J. H. (1994)**
 First total synthesis of taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1597 - 1600
- Hsiao T. Y., Bacani F., Carvalho E. B., Curtis W. R. (1999)**
 Development of a low capital investment reactor system: application for plant cell suspension culture. *Biotechnol. Prog.* 195-213
- Hwang I. (2000)**
 A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 6224-6229
- Ito H. Miyazaki T., Ono M., Sakurai H. (1998)**
 Antiallergic Activities of Rabdosin and its Related Compounds: Chemical and Biochemical Evaluations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6: 1051 - 1056
- Jagtap P. G. and Kingston D. G. I. (1999)**
 A Facile N-Debenzylation of Paclitaxel: Conversion of Paclitaxel to Docetaxel. *Tetrahedron Letters* 40: 189 - 192
- Joos H.J., Hahlbrock K. (1992)**
 Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.) Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. *Eur. J. Biochem.* 204: 621-629
- Karwatzki B (1992)**
 Biochemische und immunchemische Untersuchungen zur Hydroxyzimtsäure:CoA Ligase aus Rosmarinsäurebildenden Zellkulturen von *Coleus blumei* Benth. Dissertation, Universität Düsseldorf
- Karwatzki B., Petersen M., Alfermann A. W. (1989)**
 Transient activity of enzymes involved in the biosynthesis of rosmarinic acid in cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med.* 55: 663 - 664
- Kempin B., Petersen M., Alfermann A.W. (1993)**
 Partial purification and characterization of tyrosine aminotransferase from cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med.* 59 Suppl.: A684
- Kempin B. (1994)**
 Untersuchungen zur Rosmarinsäuresynthese in Suspensionskulturen von *Coleus blumei*: Tyrosin Aminotransferase. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf
- Kern A. J., Dyer W. E. (1998)**
 Compartmental Analysis of Herbicide Efflux in Susceptible and Difenzoquat - Resistant *Avena fatua* L. Suspension Cells. *Pesticide biochemistry and Physiology* 61: 27 - 37
- Knobloch K. H., Hahlbrock K. (1977).**
 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Hoffm. Arch. Biochem. Biophys.* 184: 237-248

- Koukol J., Conn E. E. (1961)**
Metabolism of aromatic compounds in higher plants. J. Biol. Chem., 236: 2692 - 2698
- Kusnadi A.R., Nikolov Z.L., Howard J.A. (1997)**
Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical consideration. Biotechnol. Bioeng. 56: 473 - 481
- Kyriacos C. Nicolaou R. K., Potier G., Potier P. (1996)**
Taxoide: Neue Waffen gegen Krebs. Spektrum der Wissenschaft 10: 76-80
- Laemmli U. K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Lebowitz R. J. (1985)**
The genetics and breeding of *Coleus*. Plant Breeding Reviews 2: 343-360
- Lee D., Douglas C. J. (1996)**
Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:coenzymeA ligase (4CL) gene family. CDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins.
- Lee S. W., Nazar R. N., Powell D. A., Robb J. E. (1992)**
Plant Molecular Biology, 18:-345
- Lewit-Bentley A., Rety S. (2000)**
EF-hand calcium-binding proteins. Current Opinion in structural Biology 10: 637-643
- Lois R., Dietrich A., Hahlbrock K., Schulz W. (1989)**
A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. Embo J. 8: 1641 - 1648
- Luckner M. (1990)**
Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Springer Verlag , Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo, Hongkong
- Magnuson K., Linzmaier P.M., Gao J.W., Reeves R., An G., Lee J.M (1996)**
Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells. Protein Expr. Purif. 7: 220 - 228
- May G., Willuhn G. (1978)**
Antivirale Wirkung wässriger Pflanzenextrakte in Gewebekulturen. Arzneim. Forsch. 28: 1 - 7
- Meinhard J. (1995)**
Identifizierung und Reinigung der Rosmarinsäuresynthase aus Zellkulturen von *Coleus blumei*. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Menke H. (1990)**
Sekundärstoffe – eine Überlebensstrategie der Pflanzen. Biologie in unserer Zeit 2: 94 - 101
- Mølgaard P., Ravn H. (1988)**
Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. Phytochemistry 1988, 27: 2411 - 2421
- Nakajima K., Hashimoto T. (1999)**
Two tropinone reductases, that catalyse opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. Plant Cell Physiol. 40: 1099-1107
- Nakayama N., Kawasaki H., Kretsinger R. (2000)**
Evolution of EF-hand proteins. Topics Biol. Inorg. Chem 3: 29-58

- Nayak N.R., Patnaik S., Rath S.P. (1997)**
Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. Plant Cell Reports 16: 583-586
- Negrel J. und Javelle F. (1997)**
Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase from tobacco cell suspension cultures. Eur. J. Biochem. 247: 1127 - 1135
- Nicolaou K. C., Yang Z., Liu J. J., Ueno H., Nantermet P. G., Gui R. K., Claiborne C. F., Renaud J., Louladouros E. A., Pautvannan K., Sorensen E. J. (1994)**
Total synthesis of taxol. Nature 367: 630 - 634
- Ohl S., Hahlbrock K., Schäfer E. (1989)**
A stable blue-light-derived signal modulates ultraviolet-light-induced activation of the chalcone-synthase gene in cultured parsley cells. Planta (Berl.) 177: 228 - 236
- Ornstein L. (1964)**
Disc electrophoresis I - background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 321-349
- Osakabe Y., Ohtsubo Y., Kawai S., Katayama Y., Morohoshi N. 1995**
Structure and tissue-specific expression of genes for phenylalanine ammonia-lyase from a hybrid aspen, *Populus kitakamiensis*. Plant Science 105: 217-226
- Parnham M. J., Kesselring K. (1985)**
Rosmarinic acid. Drugs of the Future 10: 756-757
- Pedersen J.A. (2000)**
Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. Biochemical Systematics and Ecology 28: 229 - 253
- Perez S., Anthony P., Jelodar N. B., Lowe K. C., Power J. B., Davey M. R. 1992**
Pluronic F-68 Increases the Post-thaw Growth of Cryopreserved Plant Cells. Cryobiology 33: 508-514
- Petersen M., Alfermann A.W. (1988)**
Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *Coleus blumei*: hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. Z. Naturforsch. 43c, 501-504
- Petersen M.S. (1991)**
Characterization of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei*. Phytochemistry 30, 2877-2881
- Petersen M., Häusler E., Karwatzki B., Meinhard J. (1993)**
Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. Planta 1993, 189, 10 - 14
- Petersen M. (1993)**
Die Biosynthese und Akkumulation der Rosmarinsäure in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* Benth. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse. Habilitationsschrift, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Petersen M. Häusler E., Meinhard J., Karwatzki B., Gertlowski C. (1994)**
The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Tissue Org. Cult. 38: 171 - 179
- Petersen M. (1994)**
Coleus spp.: In vitro culture and the production of forskolin and rosmarinic acid. Biotechnology in Agriculture and Forestry 26, Bajaj Y. P. S. (Hrsg.), pp: 69-92, Medicinal and Aromatic Plants VI, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

- Petersen M., Van der Straeten D., Bauw G. (1995)**
Full-length cDNA clone from *Coleus blumei*. Plant Cell Tissue Org. Cult. 38: 171 - 179
- Petersen M. (1997)**
Cytochrome P 450-dependant hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. Phytochemistry 30: 2877-2881
- Proksch P. (1991)**
Pflanzliche Sekundärstoffe als chemischer Fraßschutz gegen herbivore Insekten. Pharmazie in unserer Zeit 20: 217 - 224
- Rampart M., Beetens J. R., Bult H., Herman A. G., Parnham M. J., Winkelmann J. (1986)**
Complement-dependent stimulation of prostacyclin biosynthesis: Inhibition by rosmarinic acid. Biochem. Pharmacol. 35: 1397 - 1400
- Reinhard E., Alfermann A. W. (1980)**
Biotransformation by plant cell cultures. Advances in Biochemical Engineering 16: Plant Cell Cultures, Fiechter A. (Hrsg.), 51 - 83, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Richter G. (1996)**
Biochemie der Pflanzen. pp: 387 - 448 Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Ritschel W. A., Starzacher A., Sabouni A., Hussain A. S. Koch H. P. (1989)**
Percutaneous absorption of rosmarinic acid in the rat. Meth. Exp. Clin. Pharmacol. 11: 345 - 352
- Sahu A., Rawal N., Pangburn M. K. (1999)**
Inhibition of Complement by Covalent Attachement of Rosmarinic Acid to activated C3b. Biochemical Pharmacology 57: 1439 - 1446
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989)**
Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sarma A. D., Sreelakshmi Y., Sharma R. (1997)**
Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. Phytochemistry 8: 2233 - 2243
- Sarma A. D., Sharma R. (1999)**
Purification and characterization of UV-B induced phenylalanine ammonia-lyase from rice seedlings. Phytochemistry 50: 729-737
- Scarpati M. L., Oriente G. (1958)**
Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off.*). Ric. Sci. 28: 2329-2333
- Seitz H. U., Seitz U., Alfermann W. A. (1985)**
Pflanzliche Gewebekulturen - Ein Praktikum. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New-York
- Shanks J.V., Morgan J. (1999)**
Plant "hairy root" culture. Current Opinion in Biotechnology 10: 151 - 155
- Sharan M., Taguchi G., Gonda K., Jouke T., Shimosaka M., Hayashida N., Okazaki M. (1998)**
Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. Plant science 132: 13-19
- Sheen J., Zhou L., Jang J. C. (1999)**
Sugars as signaling molecules. Current Opinion in Plant Biology 2: 410-418

- Son S.H., Choi S. M., Lee Y. H., Choi K. B., Yun S. R., Kim J. K., Park H. J., Kwon O. W., Noh E. W., Seon H. J., Park Y. G. (2000)**
Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Reports* 19: 628 - 633
- Southern E. M. (1975)**
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503 - 517
- Stierle A., Strobel G., Stierle D. (1993)**
Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260: 214-216
- Stöckigt J., Schmidt D., Ruyter C. M. (1989)**
Pflanzliche Zellkulturen - Biosynthese, Enzyme und Enzymprodukte. *Deutsche Apotheker Zeitung* 129: 2767-2772
- Strack D., Keller H., Weissenböck G. (1987)**
Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of sugar acids and hydroaromatic acids by protein preparations from rye (*Secale cereale*) primary leaves. *J. Plant Physiol.* 131: 61-73
- Stryer L. (1991)**
Biochemie. Korrigierter Nachdruck der Auflage 1990. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Szabo E. (1993)**
Versuche zur Rosmarinsäuresynthese mit Zellkulturen und Pflanzen von *Coleus blumei*. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.
- Takeda R., Hasegawa J., Sinozaki K. (1990)**
Phenolic compounds from *Anthocerotae*. Bryophytes. Their chemistry and chemical Taxonomy, Zinsmeister, H.D., Mues R. (Hrsg.) 201 – 207, Oxford Science Publications, Oxford
- Terashima M., Murai Y., Kawamura M., Nakanishi S., Stoltz T., Chen L., Drohan W., Rodriguez R.L., Katoh S. (1999)**
Production of functional human α 1-antitrypsin by plant cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 516 - 523
- Ulbrich B., Wiesner W., Arens H. (1985)**
Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures Neumann K.H., Barz W., Reinhard E. (Hrsg.), pp: 293-303. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Ushiyama K. (1991)**
Large scale cultivation of ginseng. In: Komamine A., Misawa M., DiCosmo F. (Hrsg.) *Plant Cell Culture in Japan 92-98* CMC Co., Tokyo
- Uhlmann A., Ebel J. (1993)**
Molecular Cloning and Expression of 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase, an Enzyme Involved in the Resistance Response of Soybean (*Glycine max* L.) against Pathogen Attack. *Plant Physiol.* 102: 1147-1156
- Van Kessel K. P., Kalter E. S., Verhoef J. (1986)**
Rosmarinic acid inhibits external oxydative effects of human polymorphonuclear granulocytes. *Agents Actions* 17: 375 - 376
- Verweij-van Vught A. M. J. J., Appelmek B. J., Groeneveld A. B. J., Sparrius M., Thies L. G., MacLaren D. M. (1987)**
Influence of Rosmarinic acid on opsonization and intracellular killing of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by porcine and human polymorphonuclear leucocytes. *Agents Actions* 22: 288 - 294

- Vetter E. (1988)**
Biosynthese der Rosmarinsäure: Enzymatische Untersuchung zur Bildung der "Zimtsäure"-CoA-Ester bei Suspensionskulturen von *Coleus blumei*.
Diplomarbeit, Universität Tübingen
- Vitrac X., Larronde F., Krisa S., Decendit A., Deffieux G., Merillon J. M. (2000)**
Sugar sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry* 53: 659-665
- Wickremeshinhe E. R. M. und Arteca R. N. (1997):**
Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 41, Medicinal and Aromatic Plants, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 415 - 442
- Wölbling R. H., Leonhard K. (1994)**
Local therapy of *Herpes simplex* with dried extract from *Melissa officinalis*.
Phytomedicine 1: 25-31
- Yu M. und Facchini P. J. (1999)**
Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase from opium poppy. *Planta* 209: 33 - 44
- Zenk M. H. (1991)**
Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* 30, 3861 - 3863
- Zenk M. H., El Shagi H., Ulbrich B. (1977)**
Production of rosmarinic acid by cell suspension cultures of *Coleus blumei*.
Naturwissenschaften 64: 585 - 586
- Zinsmeister H.D., Becker H., Eicher T. (1991)**
Moose, eine Quelle biologisch aktiver Naturstoffe? *Angew. Chemie* 103: 134-151

6.3: Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
CAH	Zimtsäure 4-Hydroxylase (Cinnamic acid 4-hydroxylase)
Caf-CoA	Kaffeoyl-CoA
Isorinsäure	Kaffeoyl-4-hydroxyphenyllactat
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
4 CL	4-Cumarat:CoA Ligase
CoA	Coenzym A
CSPD	Di-Natrium 3-(4-methoxyspiro (1,2-dioxyethan-3,2' - (5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 3,7] decan)-4-yl) phenyl phosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton (Gewichtseinheit für Proteine)
DHPL	3,4-Dihydroxyphenyllactat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	Staatliche Drogenaufsichtsbehörde (Federal Drug Administration)
HPLC	Hochdruck flüssig Chromatographie (High pressure liquid Chromatography)
HPPR	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase
Kbp	Kilobasenpaare (1000bp)
KDa	Kilodalton (1000 Dalton)
LMW	Geringes Molekulargewicht (low molecular weight)
MALDI-TOF	Matrix unterstützte Laserdesorptions / ionisations Massenspektroskopie. Time of flight)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Nano-ES	Nano Elektrospray
PAL	Phenylalanin Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pHPL	4-Hydroxyphenyllactat
pfu	Plaque bildende Einheit (plaque forming unit) Mengenangabe bei Bakteriophagen
RA	Rosmarinsäure (Rosmarinic acid)
RAS	Rosmarinsäuresynthase (Rosmarinic acid synthase)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese mit SDS in Gel und Puffer
TAT	Tyrosin Aminotransferase
TBE	Tris / Borat / EDTA Puffersystem
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminoethan

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei gilt mein Dank im Besonderen:

- ◆ Frau Prof. Dr. Petersen für die Überlassung des Themas, eine hervorragende Betreuung, wertvolle Ratschläge und moralische Unterstützung.
- ◆ Herrn Prof. Dr. Alfermann für seine freundliche Unterstützung bei allerlei Formalien und der Durchführung dieser Arbeit.
- ◆ Herrn Prof. Dr. Hunziker für die Möglichkeit die Peptidsequenzierung an seinem Institut durchführen zu können.
- ◆ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im ersten Jahr meiner Arbeit
- ◆ Allen jetzigen und ehemaligen Kollegen für gute Teamarbeit und fachliche Anregungen. Besonderen Dank verdienen Kyung-Hee, Johanna, Ute, Stefan, Marc, Juliane, Alexandra und Jörg.
- ◆ Allen jetzigen und ehemaligen Kollegen aus fremden Arbeitsgruppen, die mir stets bereitwillig Geräte ausliehen, Chemikalien überließen und Tips gaben. Besonderer Dank gilt hier Karin, Inga, Ina und der gesamten Arbeitsgruppe Westhoff in Düsseldorf.
- ◆ Frank für moralische Unterstützung, praktische Hilfe bei Computerproblemen und ständige Bereitschaft zu helfen.
- ◆ Meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium ermöglicht haben sondern auch in allen anderen Belangen ständig für mich da waren.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die Dissertation selbstständig und nur mit den aufgeführten Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Marburg, Januar 2001