

**Genexpressionsanalysen in elicierten Suspensionskulturzellen von
Eschscholzia californica Cham. und Identifizierung von EcaERF2 als
transkriptioneller Regulator der Alkaloidbiosynthese**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlich Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn **Tobias Kurz**
geboren am 18.05.1973 in Braunschweig

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. T. M. Kutchan (St. Louis, USA)
2. Prof. Dr. C. Gatz (Göttingen)
3. Prof. Dr. W. Roos (Halle, Saale)

Halle (Saale), den 10. November 2009

Für meine Lieben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel	1
1.2	<i>Metabolic engineering</i>	6
1.3	Transkriptionsfaktoren des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels	10
1.4	Die Biosynthese der Benzo[<i>c</i>]phenanthridinalkaloide	19
1.5	<i>E. californica</i> Suspensionszellkulturen als experimentelles System	26
1.6	Die Regulation der Benzo[<i>c</i>]phenanthridinalkaloidbiosynthese	28
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	31
2	Material und Methoden	33
2.1	Material	33
2.1.1	Pflanzliches Material	33
2.1.2	Bakterienstämme	33
2.1.3	Plasmide	34
2.1.4	Oligonukleotide	35
2.1.5	Chemikalien und Enzyme	36
2.1.6	Geräte	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	38
2.2.1.1	Isolierung von genomischer DNA	38
2.2.1.2	Isolierung von pflanzlicher Gesamt-RNA	38
2.2.1.3	Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA	39
2.2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA	39
2.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA im 96er-Format	39
2.2.1.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.2.1.7	Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren	40
2.2.2	Gelelektrophorese	40
2.2.2.1	Trennung von DNA über Agarosegele	40
2.2.2.2	Trennung von RNA über Agarosegele	41
2.2.2.3	Trennung von Proteinen über Polyacrylamidgele	41
2.2.3	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren	42
2.2.3.1	DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen	42
2.2.3.2	Ligation von DNA	42

2.2.3.3	Radioaktive Markierung von DNA	42
2.2.4	Blotting und Hybridisierung von Nukleinsäuren	43
2.2.5	Amplifizierung von DNA durch die Polymerasekettenreaktion	43
2.2.6	Schnelle Amplifizierung von DNA-Enden (RACE)	44
2.2.7	Klonierung von genomischer DNA	44
2.2.8	Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	44
2.2.9	Erstellung der cDNA-Bibliothek	45
2.2.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA	45
2.2.11	cDNA-Microarrays	46
2.2.11.1	Reamplifizierung der cDNA-Inserts mittels PCR	46
2.2.11.2	Aufreinigung der PCR-Fragmente	46
2.2.11.3	Drucken der Arrays auf Membranen	47
2.2.11.4	Reverse Transkription und radioaktive Markierung	47
2.2.11.5	Hybridisierung der Microarray-Membranen	48
2.2.11.6	Auswertung der cDNA-Microarrays	48
2.2.12	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	49
2.2.13	Gelretardationsassays	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Erstellung einer <i>E. californica</i> EST-Datenbank	52
3.1.1	Erstellung einer cDNA-Bibliothek und EST-Sequenzierung	52
3.1.2	Verknüpfung der EST-Sequenzen zu Contigs	53
3.1.3	Annotation der EST-Sequenzen	55
3.1.4	Identifizierung von cDNA-Sequenzen für Enzyme der Alkaloidbiosynthese	61
3.1.5	Identifizierung von cDNA-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren	66
3.2	Genexpressionsanalysen in elicierten Suspensionskulturzellen	67
3.2.1	Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Microarrays	67
3.2.2	Genexpressionsanalysen mittels Northern Blot	76
3.3	Isolation und <i>in silico</i>-Analyse des Promotorbereiches von Genen der Alkaloidbiosynthese	79
3.3.1	Isolation des Promotorbereiches des Berberinbrückenenzym	79
3.3.2	Isolation des Promotorbereiches der 3'-Hydroxy- <i>N</i> -Methylcoclaurin-4'- <i>O</i> -Methyltransferase	82
3.3.3	Isolation des Promotorbereiches der Norcoclaurin-6- <i>O</i> -Methyltransferase	83
3.4	Funktionelle Charakterisierung des Transkriptionsfaktors EcaERF2	84

3.4.1	Sequenzanalyse von EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3	85
3.4.2	Heterologe Expression des Transkriptionsfaktors EcaERF2 in <i>E. coli</i>	93
3.4.3	DNA-Bindungsstudien mittels Gelretardationsassays	95
4	Diskussion	99
4.1	EST-Sequenzierung und globale Genexpressionsanalysen als Methoden zur Identifikation neuer cDNAs	99
4.1.1	Funktionell charakterisierte cDNAs der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese und Kandidaten-cDNAs	101
4.1.1.1	Methyltransferasen der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese	102
4.1.1.2	Cytochrom-P450-Enzyme der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese	103
4.2	Genexpressionsanalysen zeigen eine koordinative Induktion der Alkaloidbiosyntheseenzyme	109
4.3	<i>In silico</i> Analyse der Promotoren von Genen der Alkaloidbiosynthese	114
4.4	Transkriptionelle Regulatoren der Alkaloidbiosynthese	117
4.5	Weiterführende Versuche	122
5	Zusammenfassung	124
6	Literaturverzeichnis	127
7	Anhang	153
7.1	cDNA-Sequenzen und daraus abgeleitete Aminosäuresequenzen	153
7.2	Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer	165

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Anglizismen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AP2	<i>APETALA 2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BBE	Berberinbrückenzym
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CBF	<i>C-repeat-binding factor</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHS	(S)-Cheilanthifolin-Synthase
CNMT	(S)-Coclaurin-N-Methyltransferase
CPR	NADPH:Cytochrom-P450-Reduktase
CYP	Cytochrom-P450-Enzym
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRE	<i>dehydration-responsive element</i>
DREB	<i>dehydration-responsive element-binding factor</i>
Eca	<i>Eschscholzia californica</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Gelretardationsassay (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
EREBP	<i>ethylene-responsive element binding protein</i>
ERF	<i>ethylene-responsive transcription factor</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FGP	<i>Floral Genome Project</i>
×g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
JA	Jasmonsäure
JERE	<i>jasmonate and elicitor-responsive element</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
MeJA	Methyljasmonat
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NMT	N-Methyltransferase
OMT	O-Methyltransferase
OPDA	12-oxo-Phytodiensäure
ORA	<i>octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2/ERF domain protein</i>
ORCA	<i>octadecanoid-responsive Catharanthus AP2/ERF domain protein</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
RTase	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
STS	(S)-Stylopin-Synthase
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TNMT	(S)-Tetrahydroprotoberberin-(<i>cis</i>)- <i>N</i> -Methyltransferase
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

Ein- und Drei-Buchstabencode der Aminosäuren:

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

Abkürzungen der Nukleinbasen:

A	Adenin	R	Purin (A oder G)	M	Aminogruppe (A oder C)
C	Cytosin	Y	Pyrimidin (C oder T)	K	Ketogruppe (G oder T)
G	Guanin	S	Strong (C oder G)	H	nicht G (A, C oder T)
T	Thymin	W	Weak (A oder T)	B	nicht A (C, G oder T)
V	nicht T (A, C oder G)	D	nicht C (A, G oder T)	N	beliebige Base (A, C, G oder T)

1 Einleitung

1.1 Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel

Pflanzen und höhere Pilze besitzen die Fähigkeit eine ungeheure Vielfalt von Naturstoffen zu synthetisieren, welche von zentraler Bedeutung für die Wechselwirkung mit ihrer biotischen und abiotischen Umwelt sind. Zu diesen Sekundärstoffen werden mehr als 25.000 Terpenoide, circa 8.000 Phenylpropanoide und ungefähr 12.000 Alkaloide gezählt (Croteau *et al.*, 2000). Andere Autoren unterteilen die Naturstoffe nach ihrer biosynthetischen Herkunft (siehe **Abb. 1.1**) in Polyketide, Isoprenoide, Alkaloide, Phenylpropanoide und Flavonoide (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004). Die Polyketide werden durch den Acetat-Mevalonat-Stoffwechsel gebildet. Die Isoprenoide (Terpenoide und Steroide) leiten sich vom Isopentenylidiphosphat ab, welches in Pflanzen durch den Acetat-Mevalonat-Stoffwechsel oder den plastidären Methylerythritolphosphat (MEP-) Stoffwechselweg synthetisiert werden kann. Den Alkaloiden dienen verschiedene Aminosäuren als Vorläufer. Die Phenylpropanoide leiten sich von den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin ab. Die Flavonoide werden durch die Kombination von Phenylpropanoiden und Polyketiden produziert.

Inzwischen manifestiert sich zunehmend die Erkenntnis, dass der Sekundärstoffwechsel nicht, wie früher angenommen, der reinen Entsorgung von Stoffwechselprodukten des Primärstoffwechsels dient, sondern der Produktion von für die Pflanze wichtigen Substanzen dient. Diese erfüllen sehr verschiedene Funktionen, die vom Anlocken von bestäubenden Insekten und Samenverbreitenden Tieren, dem Schutz vor Herbivoren und mikrobiellen Schädlingen bis zur Wirkung als allelopathisches Repellent reichen (Wink, 2003; Hartmann, 2007).

Die Naturstoffe haben aber auch für den Menschen zum Teil eine enorme Bedeutung als Pigmente, Aromastoffe und wichtige Arzneistoffe. Mehr als 25 % der in den letzten 30 Jahren neu zugelassenen Medikamente basieren auf Substanzen pflanzlichen Ursprungs und etwa 50 % der meistverkauften Chemikalien entstammen der Kenntnis des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels (Terry *et al.*, 2006). Paclitaxel (Taxol[®]) kann aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) gewonnen werden und wird in der Chemotherapie verschiedener maligner Tumore eingesetzt. Es wirkt als Mitosehemmer, indem es den Abbau der Mikrotubuli in der Mitosespindel inhibiert. Da diese Eibenart nur eine sehr geringe Verbreitung hat und der Taxolgehalt sehr gering ist, kann sie nicht den Weltbedarf an Paclitaxel decken. Seit einigen Jahren wird daher Paclitaxel überwiegend partialsynthetisch aus dem in den Nadeln der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) vorkommenden Baccatin III gewonnen. Artemisinin ist ein Sesquiterpen, welches in den Blättern und Blüten des

Einjährigen Beifußes (*Artemisia annua*) vorkommt. Es wird zur Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Stämmen von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, eingesetzt (Pandey *et al.*, 1999). Digoxin ist ein Herzglycosid aus dem Fingerhut (*Digitalis lanata*). Das Aglycon Digoxigenin (Steroid) ist mit drei Zuckerresten verknüpft und wird bei chronischer Herzinsuffizienz eingesetzt. Digoxigenin wird auch in der Molekularbiologie zur Markierung von DNA und RNA benutzt. Etoposid und Teniposid sind semi-synthetische Glycosid-Derivate des Podophyllotoxins, das aus *Podophyllum peltatum* (Amerikanischer Maipfel) isoliert wird. Sie werden als Zytostatika in der Chemotherapie verwendet und ihre Wirkung beruht auf der Inhibition der DNA-Synthese und der Replikation durch Hemmung der Topoisomerase II (Chen *et al.*, 1984).

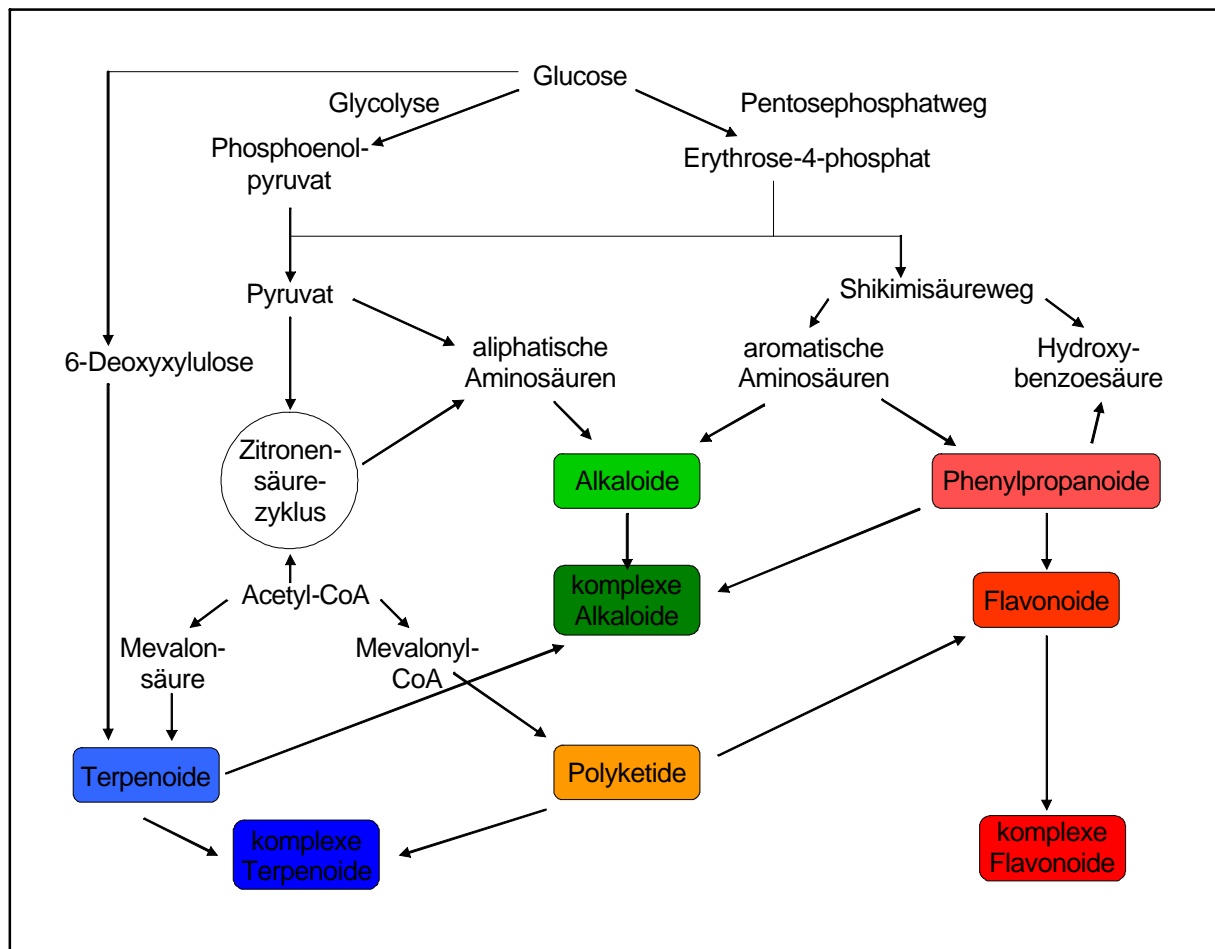


Abb. 1.1: Schematische Übersicht der Stoffwechselwege zentraler Naturstoffgruppen.

Die Alkaloide stellen eine besonders wichtige Gruppe der biologisch aktiven Naturstoffe dar. Ungefähr 20 % der Angiospermen produzieren Alkaloide, jedoch ist die Synthese bestimmter Alkaloide in der Regel auf wenige Pflanzenfamilien beschränkt und jede Spezies besitzt ein einzigartiges Metabolitenprofil. In den entsprechenden Pflanzenfamilien ist die

Produktion von Alkaloiden dagegen oft weit verbreitet. So produzieren viele Gattungen der Solanaceae Tropanalkaloide, die Mitglieder der Apocynaceae und Loganiaceae Monoterpenindolalkaloide und die Vertreter der Papaveraceae Benzylisochinolinalkaloide. Einige Beispiele (siehe **Abb. 1.2**) sollen die Bedeutung der Alkaloide für die Pflanze und die medizinische Nutzung durch den Menschen verdeutlichen.

Catharanthus roseus (L.) G. Don. (Madagaskar-Immergrün) enthält mehr als einhundert verschiedene Monoterpenindolalkaloide, von denen die Bisindolalkaloide Vincristin (Oncovin[®]) und Vinblastin (Velban[®]) als Zytostatika in der Krebstherapie eingesetzt werden. Ein weiteres pflanzliches Zytostatikum ist das Camptothecin, welches aus *Camptotheca acuminata* (Glücksbaum) isoliert wird. Camptothecin und seine semi-synthetischen Derivate Topotecan und Irinotecan hemmen die Topoisomerase I (Rothenberg, 1997). Das Monoterpenindolalkaloid Emetin kommt in der tropischen Pflanze *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Brechwurzel) vor, wird als Emetikum verwendet und besitzt amöbizide Wirkung. Ajmalin ist ein Indolalkaloid, das aus der Wurzel von *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. (Indische Schlangenzwurz) isoliert wird und als Antiarrhythmika zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen eingesetzt wird. Reserpin, ebenfalls in *Rauvolfia*, aber auch in der australischen Bitterrinde („Iodstrauch“, *Tabernaemontana orientalis*) vorkommend, ist ein Antisymphotonikum und wurde als Mittel gegen Bluthochdruck verwendet. Früher wurde es auch in der Psychiatrie als Neuroleptikum bei Schizophrenie eingesetzt. Chinin wird aus der Rinde des Gelben Chinarindenbaum (*Cinchona officinalis*) gewonnen. Es wirkt fiebersenkend, ist ein beliebter Bittermacher in der Lebensmittelindustrie (z.B. *Bitter Lemon*, *Tonic Water*) und wurde früher in den Tropen Getränken zur Vorbeugung gegen Malaria zugesetzt.

Die Tropanalkaloide Atropin ((*R,S*)-Hyoscyamin) und Scopolamin werden in der Medizin als Parasympatholytika eingesetzt und von *Hyoscyamus niger* (Schwarzes Bilsenkraut) und weiteren Gattungen der Solanaceae synthetisiert. Das ebenfalls zu den Tropanalkaloiden gehörende Kokain aus dem Kokastrauch (*Erythroxylon coca*) wurde neben dem Missbrauch als Rauschdroge als Lokalanästhetikum eingesetzt. Wegen seines Abhängigkeitspotentials und der Toxizität wird es inzwischen so gut wie nicht mehr eingesetzt, diente aber als Leitsubstanz für viele synthetische Lokalanästhetika.

Das Piperidinalkaloid Coniin aus *Conium maculatum* (Gefleckter Schierling) bewirkt die Lähmung der motorischen Nerven. Aufgrund seiner extremen Toxizität (Schierlingsbecher des Sokrates) wird es in sehr geringen Konzentrationen in der Homöopathie verwendet.

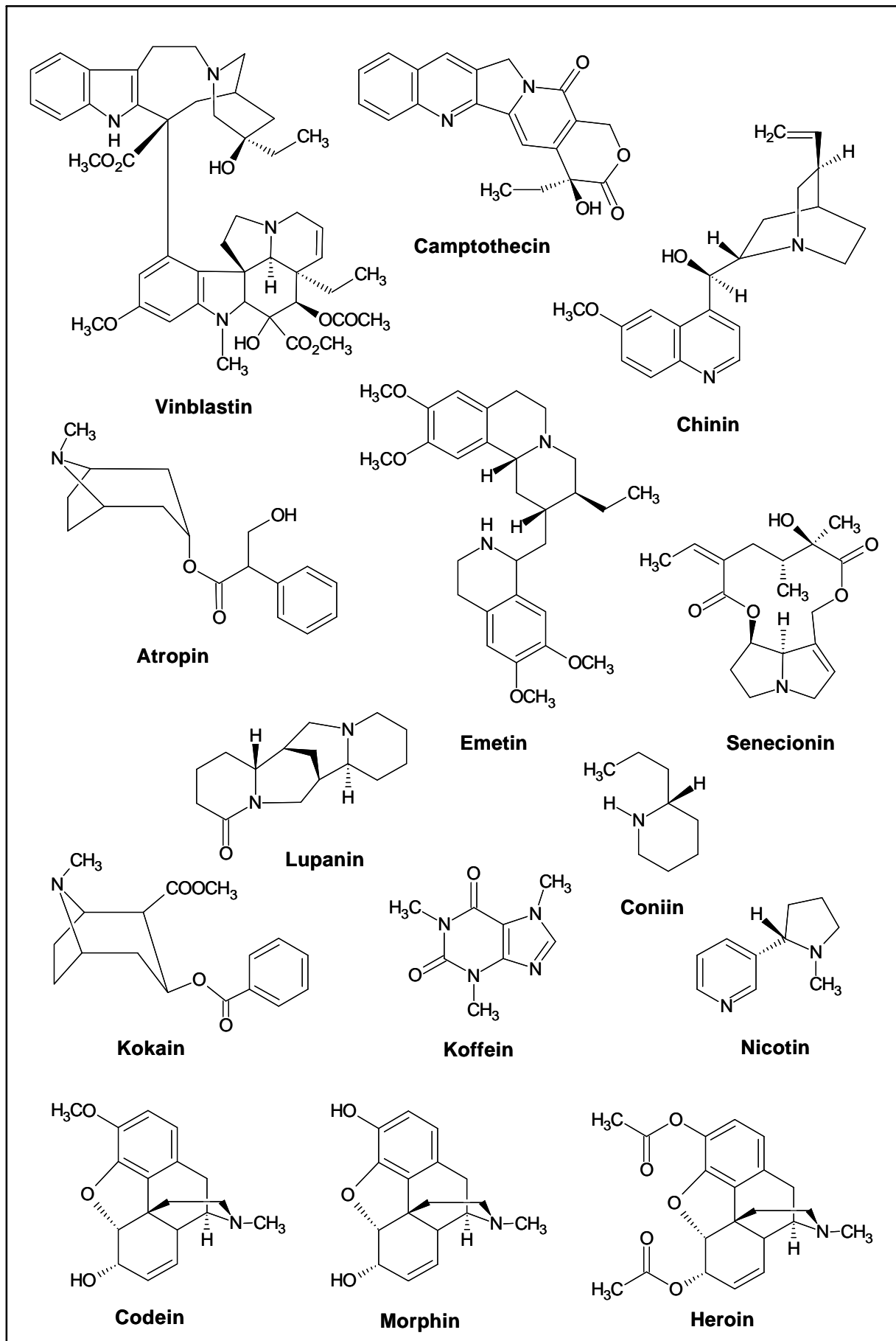


Abb. 1.2: Strukturen einiger pflanzlicher Alkaloide mit pharmakologischer und kommerzieller Bedeutung.

Ebenfalls Anwendung in der Homöopathie findet das Strychnin der Brechnuss (*Strychnos nux-vomica*). Das toxische Colchicin aus der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) ist ein Mitose-Hemmstoff, der die Ausbildung der Spindelfasern hemmt, indem es an freie Mikrotubuli-Untereinheiten bindet. Colchicin lindert aber auch die Gelenkschmerzen bei Gicht.

Im Milchsaft des Schlafmohns (*Papaver somniferum* L.) kommen gleich eine ganze Reihe pharmazeutisch wichtiger Benzylochinolinalkaloide vor: Das analgetische Morphin, das als Antitussivum und mildes Analgetikum verwendete Codein, das als Vasodilatator und Relaxant der glatten Muskulatur wirksame Papaverin, das antikanzerogene und als Antitussivum wirksame Noscapin und nicht zuletzt Thebain, welches als Grundstoff für die Synthese von Oxycodon und weiteren semi-synthetischen analgetischen Opiaten verwendet wird. Das semisynthetisch, durch Diacetylierung aus Morphin hergestellte, stark analgetisch wirksame Heroin wird als Rauschmittel missbraucht.

Berberin und die Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide Sanguinarin und Chelerythrin besitzen antimikrobielle und entzündungshemmende Eigenschaften und kommen in der Wurzel bzw. im Rhizom von vielen Vertretern der Ranunculales wie z. B. *Berberis vulgaris*, *Coptis japonica*, *Thalictrum tuberosum*, *Sanguinaria canadensis*, *P. somniferum*, *Eschscholzia californica* und *Hydrastis canadensis* vor. Sanguinarin wurde in der Mundhygiene als Bestandteil von Zahnpasten und Mundwässern (Viadent[®]) angewendet, wird aber aufgrund des Verdachtes Leukoplakie (präkanzeröse Läsionen) zu begünstigen nicht mehr verwendet.

Selbst im alltäglichen Leben begegnen wir Alkaloiden wie Koffein in Form von Genussmitteln wie Kaffee, Kakao und schwarzem Tee sowie Nikotin im Zigarettenrauch. Das Purinalkaloid Nikotin wirkt stimulierend auf die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, verursacht in höheren Dosen Atemlähmung und ist ein sehr wirksames Insektizid. Die Biosynthese von Nikotin wird in Tabak durch Herbivoren stimuliert und findet in der Wurzel statt. Anschließend erfolgt der Transport in das Blatt. Pilocarpin aus dem Jaborandistrauch (*Pilocarpus jaborandi*) wirkt anregend auf den parasympathischen Anteil des vegetativen Nervensystems und wird vor allem in der Augenheilkunde bei einer Erhöhung des Augeninnendruckes (Glaukom) angewendet (Hoyng & van Beek, 2000). Tubocurarin aus *Chondrodendron tomentosum* (Grießwurz) ist ein Nervengift. Als Hauptbestandteil von Tubocurare zählt es zu den Pfeilgiften, die zusammenfassend als Curare bezeichnet werden. Tubocurarin besetzt kompetitiv die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren der postsynaptischen Membran. Es lähmt die quergestreifte Muskulatur des Bewegungsapparates und gilt deshalb als Muskelrelaxans. Das Steroidalkaloid α -Solamin ist ein Cholesterinesterase-Inhibitor und kommt in keimenden Knollen der Kartoffel und grünen

Tomaten vor und führt in größeren Konzentrationen zu schweren Vergiftungen. Die Pyrrolizidinalkaloide, die in vielen *Senecio*-Arten verbreitet vorkommen, sind hinsichtlich ihrer ökochemischen Funktion gut untersucht (Hartmann, 1999). Durch ihre Toxizität gegenüber Säugetieren verursachen Greiskrautvorkommen auf Viehweiden Vergiftungen bei Rindern und Pferden. Senecionin wird als Senecionin-*N*-oxid in der Wurzel synthetisiert und bis zu den Blüten transportiert, wo es in großen Konzentrationen akkumuliert. Die natürlich vorkommenden Pyrrolizidinalkaloide sind zunächst ungiftig und erhalten ihre Toxizität erst durch die Metabolisierung in der Leber durch Cytochrom-P450-Enzyme. Einige Insekten haben sich aber durch Co-Evolution den Pyrrolizidinalkaloid-produzierenden Pflanzen angepasst und können die Alkaloide durch enzymatische Modifikation unschädlich machen. Andere Insekten können die Pyrrolizidinalkaloide auch zu ihrem eigenen Schutz speichern oder sie in Pheromone umwandeln (Hartmann, 1999). Die Chinolizidinalkaloide wie z.B. Lupanin sind ebenfalls sehr gefährlich für Weidetiere, besonders für Schafe. Sie kommen in vielen Lupinen-Arten vor und schützen durch ihre Toxizität und zusätzlich durch ihren bitteren Geschmack die Pflanze vor Herbivoren.

Wie die oben genannten Beispiele verdeutlichen, besitzen die meisten Alkaloide starke pharmakologische Wirksamkeit und können als Teil eines chemischen Verteidigungssystems der Pflanzen angesehen werden, welches sich im Verlauf der Evolution aus dem Selektionsdruck gegenüber Predatoren und Mikroorganismen entwickelt hat. Die Grenze zwischen dem pflanzlichen Primär- und Sekundärstoffwechsel verläuft fließend und es besteht ein enger Zusammenhang insbesondere auf der Ebene der aromatischen Aminosäuren. Außerdem wird davon ausgegangen, dass sich der Sekundärstoffwechsel evolutionär durch Rekrutierung von Stoffwechsellzymen aus dem Primärstoffwechsel entwickelt hat (Pichersky & Gang, 2000; Ober, 2005).

1.2 *Metabolic Engineering*

Aufgrund ihrer oftmals sehr komplexen Strukturen, ist die chemische Synthese vieler Naturstoffe nicht effizient und obwohl einige Totalsynthesen z.B. für das Morphin (Rice, 1980; Novak *et al.*, 2000) und das Taxol (Nicolaou *et al.*, 1994) existieren, sind diese eher von akademischem Interesse, jedoch nicht wirtschaftlich vertretbar. Deshalb ist die wichtigste Quelle zur Isolation vieler Naturstoffe immer noch die Pflanze selbst. Die meisten Heilpflanzen werden jedoch nicht kommerziell kultiviert, sondern entstammen der Wildsammlung. Die natürlichen Vorkommen sind allerdings begrenzt und werden den

steigenden Bedarf in Zukunft nicht decken. Bereits jetzt befinden sich 4.000 bis 10.000 Medizinalpflanzen auf der Liste der bedrohten Arten und ihre Zahl wird vermutlich weiter zunehmen (Canter *et al.*, 2005).

Als Ausweg wurde, seit ihrer Etablierung in den 1970iger Jahren, die Verwendung von pflanzlichen Zellkulturen angesehen. Diese bieten einige Vorteile (Zenk, 1991): Sie sind in großen Mengen und Saison-unabhängig verfügbar. Die Zellen einer Kultur besitzen einen uniformen, relativ undifferenzierten Entwicklungszustand. Der störende Einfluss von Mikroorganismen kann ausgeschlossen werden und die Applikation von Elicitoren und Phytohormonen ist leicht möglich. Außerdem können pflanzliche Zellkulturen innerhalb einer zweiwöchigen Kulturdauer große Mengen an Naturstoffen produzieren. Die Ganzpflanze benötigt dafür einen wesentlich längeren Zeitraum. Jedoch gibt es auch Nachteile, welche die Anwendung als Produktionssysteme für Naturstoffe limitieren. Dazu zählen die hohen Kosten für Bioreaktoren und die Instabilität einiger Zelllinien, die ihre Fähigkeit bestimmte Metabolite zu bilden während der Kulturdauer verlieren. Außerdem werden oftmals nicht alle Substanzen, die in der Gesamtpflanze vorkommen, auch in Zellkultursystemen produziert. So produzieren Suspensionszellkulturen von *P. bracteatum* keine Morphinanalkaloide wie Codein und Morphin (Kutchan *et al.*, 1983; Rush *et al.*, 1985). Die Produktion der dimeren Monoterpenindolalkaloide Vinblastin und Vincristin in Suspensionszellkulturen von *C. roseus* ist ebenfalls nicht möglich, da die Zellkulturen kein Vindolin synthetisieren (De Luca *et al.*, 1986; Vázquez-Flota *et al.*, 2002; Murata & De Luca, 2005). Ein Beispiel für die kommerzielle Produktion von Naturstoffen in Zellkulturen ist die Produktion von Shikonin in Suspensionszellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* (Verpoorte *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2005).

Oftmals ist es wünschenswert die Gehalte oder das Profil der sekundären Inhaltsstoffe in Pflanzen zu verändern. Ziele sind dabei unter anderem die Verbesserung der Agrareigenschaften durch Metabolite, welche die Pflanze vor Insektenfraß oder Pathogenbefall schützen sollen, die Verringerung von schädlichen oder Qualitätsmindernden Faktoren in Ernährungs- und Futterpflanzen, die Erhöhung der Gehalte von wünschenswerten Inhaltsstoffen oder die Produktion von neuen Metaboliten. Zusätzlich zu den konventionellen und meist sehr zeitintensiven Methoden der Pflanzenzüchtung gewinnt immer mehr das *Metabolic engineering* an Bedeutung, das die gezielte Veränderung des pflanzlichen Metabolismus mittels molekularbiologischen und gentechnischen Methoden zum Ziel hat (Verpoorte *et al.*, 2000; Oksman-Caldentey & Inzé, 2004). Durch ektopische Expression von Genen lässt sich der gesamte Fluss eines Stoffwechselweges bis zum gewünschten Endprodukt erhöhen,

einzelne limitierende Schritte beschleunigen oder auch Flüsse in konkurrierende Nebenstoffwechselwege reduzieren. Um neue Inhaltsstoffe zu erzeugen (*recombinatorial biochemistry*), können auch heterologe Gene in die Pflanze eingebracht werden, welche Vorstufen des Stoffwechselweges produzieren. Eine Reduzierung oder Eliminierung von ungewünschten Substanzen lässt sich durch Blockierung des Stoffwechselweges oder durch Umleitung des Flusses in einen konkurrierenden Stoffwechselweg erreichen. Einzelne enzymatische Reaktionen werden durch Suppression der Genexpression mittels *antisense*- oder *RNAinterference*-Technologie ausgeschaltet. Beispiele für erfolgreiches *Metabolic engineering* sind die Einführung der β -Carotin (Provitamin A)-Synthese in das Endosperm des Reis (Ye *et al.*, 2000; Paine *et al.*, 2005) oder die Produktion von Scopolamin in *Atropa belladonna* durch Überexpression der Hyoscyamin-6 β -Hydroxylase aus *H. niger* (Yun *et al.*, 1992).

Auch für die Benzylisochinolinalkaloide wurden einige Versuche des *Metabolic engineering* unternommen. Durch Suppression der (*S*)-*N*-Methylcoclaurin 3'-Hydroxylase (CYP80B1) und des Berberinbrückenenzym (BBE) in Suspensionszellkulturen von *E. californica* wurden in beiden Ansätzen reduzierte Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidgehalte bei gleichzeitig zweifach erhöhten Gehalten der Aminosäure Tyrosin erzielt (Park *et al.*, 2002). In Wurzelkulturen von *E. californica* wurde durch Überexpression und durch *antisense*-Expression des BBE die Alkaloidbiosynthese moduliert (Park *et al.*, 2003). Transgene Wurzelkulturen, die das orthologe BBE aus *P. somniferum* exprimierten zeigten eine erhöhte Akkumulation von Benzo[*c*]phenanthridinalkaloiden bei gleichzeitiger Reduktion der Gehalte mehrerer Aminosäuren. Eine Reduktion der Alkaloidgehalte und erhöhte Gehalte einiger Aminosäuren wurden in transgenen Wurzelkulturen mit supprimierter BBE-Expression festgestellt. Durch *RNAinterference* wurde die Codeinon-Reduktase (COR) in *P. somniferum* Pflanzen ausgeschaltet (Allen *et al.*, 2004). Diese Pflanzen zeigten verringerte Gehalte der Morphinanalkaloide Thebain, Codein, Oripavin und Morphin, akkumulierten aber interessanterweise das Intermediat (*S*)-Retikulin und dessen methylierte Produkte. Durch *antisense*-Suppression des BBE in *P. somniferum* veränderte sich die Zusammensetzung der Alkaloide im Latex der Pflanzen, während die Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide in der Wurzel unbeeinflusst blieben (Frick *et al.*, 2004). Durch Überexpression der COR 1.1 in *P. somniferum* gelang die Steigerung der Morphinanalkaloidgehalte (Codein und Morphin, und auch Thebain!) um 15-30 % im Vergleich zur Hochleistungssorte CO58-34 (Larkin *et al.*, 2007). Weiterhin wurde in *P. somniferum* die Expression der (*S*)-*N*-Methylcoclaurin 3'-Hydroxylase (CYP80B3) verändert (Frick *et al.*, 2007). Die Überexpression von CYP80B3 führte zu einer Steigerung

des Gesamtalkaloidgehaltes im Latex um 450 %, während die *antisense*-Suppression von CYP80B3 in einer Reduktion bis zu 84 % resultierte. Schließlich wurde der Effekt auf die Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* nach Überexpression und Suppression der Salutaridinol 7-*O*-Acetyltransferase (SalAT) untersucht (Allen *et al.*, 2008). Die Überexpression der SalAT führte zur Steigerung der Konzentration von Morphin, Codein und Thebain in der Kapsel der transgenen Pflanzen. Die Suppression der SalAT mittels RNA*interference* resultierte in der Akkumulation von Salutaridin, dem Substrat der Salutaridin-Reduktase.

Vorraussetzung für diese Art der gezielten Manipulation ist allerdings die gute Kenntnis des gesamten Stoffwechselweges und der beteiligten katalytischen Enzyme. Oft ist es jedoch sehr schwierig vorherzusagen, welche die limitierenden Schritte eines Stoffwechselweges sind. Eine relativ neue Strategie des *Metabolic engineering* zielt daher auf die Manipulation der Expression transkriptioneller Regulatoren der biosynthetischen Enzyme. So führt die ektopische Expression der beiden Transkriptionsfaktoren C1 (*Colorless1*) und R (*Red*) in Suspensionszellkulturen von Mais zur Akkumulation von Anthocyanen, während die Expression von P (*Pericarp color*) die Produktion von Flavonoiden induziert (Grotewold *et al.*, 1998). Dies zeigt, dass sich durch die Veränderung der Expression von einzelnen oder wenigen Transkriptionsfaktoren zwei eigenständige, aber sich überschneidende Flavonoidstoffwechselwege manipulieren lassen. Die gleichzeitige Expression der Transkriptionsfaktoren LC (*Leaf color*) und C1 aus Mais in der Frucht der Tomate führt zur Akkumulation von Flavonoiden im Fruchtfleisch (Bovy *et al.*, 2002). Durch die kombinierte ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren TT2 (*Transparent Testa 2*), PAP1 (*Production of Anthocyanin Pigment 1*) und LC konnte die Proanthocyanidinbiosynthese in *Arabidopsis* verändert werden (Sharma & Dixon, 2005).

Allerdings ist noch nicht viel über die Transkriptionsfaktoren des Sekundärstoffwechsels bekannt. Am besten untersucht sind die transkriptionelle Regulation des Phenylpropanoid- und Flavonoidstoffwechsels. Die beteiligten Transkriptionsfaktoren gehören größtenteils zu den MYB- und bHLH-Transkriptionsfaktoren (Allan *et al.*, 2008; Broun, 2004). Die Biosynthese der aliphatischen Glucosinolate in *A. thaliana* wird ebenfalls durch MYB-Transkriptionsfaktoren reguliert (Sønderby *et al.*, 2007). Bekannte transkriptionelle Regulatoren der Monoterpenindolalkaloidbiosynthese in *C. roseus* sind die ORCA-Proteine aus der AP2/ERF-Transkriptionsfaktor-Familie (Menke *et al.* 1999b; van der Fits & Memelink, 2000 und 2001) und die transkriptionellen Repressoren vom Zinkfinger-Typ (Pauw *et al.*, 2004).

1.3 Transkriptionsfaktoren des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels

Die Genexpression wird durch die beiden Prozesse der Transkription und der Translation bestimmt. Während bei Prokaryonten beide Vorgänge miteinander gekoppelt sind, finden bei Eukaryonten die Transkription im Nucleus und die Translation im Cytosol der Zelle statt. Das setzt einen Transport der reifen mRNA nach erfolgter Transkription in das Cytosol voraus. Neben dem basalen Transkriptionsapparat und der RNA-Polymerase sind noch weitere Proteine an der Initiation der Transkription beteiligt. So genannte „*Trans*-Faktoren“ binden an *cis*-Elemente in der Promoterregion eines Genes und regulieren dessen zeitliche und räumliche Expression.

Transkriptionsfaktoren setzen sich modular aus mehreren funktionellen Domänen zusammen (Ptashne, 1988; Liu *et al.*, 1999). In der Regel besteht ein typischer Transkriptionsfaktor aus einer DNA-Bindungsdomäne, einer Oligomerisierungsregion, einer Transkriptionsregulator-domäne und einem Kernlokalisierungssignal (siehe **Abb. 1.3**). Es gibt aber auch Transkriptionsfaktoren mit fehlender Regulator-domäne (Goff *et al.*, 1992; Czarnecka-Verner *et al.*, 2000) und ohne spezifische DNA-Bindungsdomäne (De-Vetten & Ferl, 1995; Hill *et al.*, 1996; Washburn *et al.*, 1997). Die Klassifizierung der Transkriptionsfaktoren erfolgt hauptsächlich anhand ihrer DNA-Bindungsdomänen (Pabo & Sauer, 1992). Mit wenigen Ausnahmen enthält jeder Transkriptionsfaktor nur einen Typ von DNA-Bindungsdomäne, die aber in mehreren Kopien vorliegen kann. Die DNA-Bindungsdomäne besteht oft aus basischen Aminosäuren, die an das *cis*-Element der DNA binden und die Spezifität des DNA-bindenden Proteins bestimmen. Andere Aminosäuren verstärken die Bindung des Transkriptionsfaktors, indem sie unspezifisch mit den Phosphat- oder Zuckerresten der DNA interagieren. Die basen-erkennenden Aminosäuren sind in der Regel hoch konserviert.

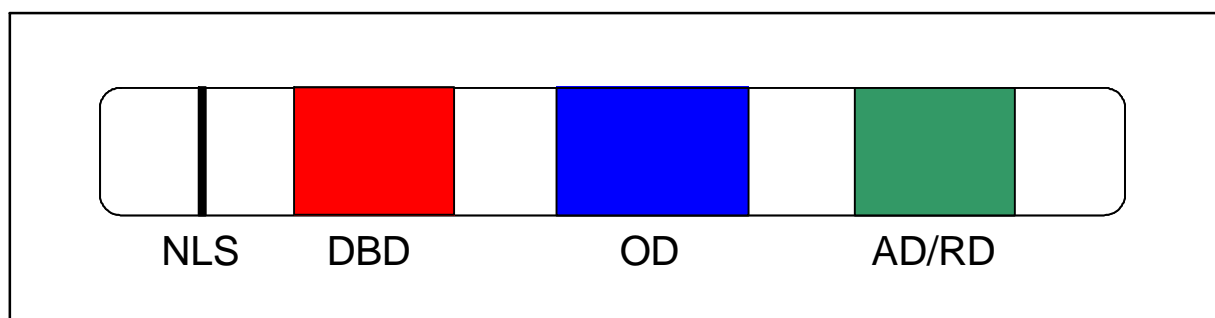


Abb. 1.3: Schematischer modularer Aufbau eines Transkriptionsfaktors. Die Reihenfolge und Anzahl der Domänen können variieren. AD/RD: transkriptionelle Aktivierungs-/Repressionsdomäne, DBD: DNA-Bindungsdomäne, NLS: (*nuclear localization signal*) Kernlokalisierungssignal, OD: Oligomerisierungsdomäne

Viele Transkriptionsfaktoren bilden Hetero- oder Homooligomere aus, welche die DNA-Bindungsspezifität und die Affinität zu Promotorelementen beeinflusst. Die Aminosäuren der Oligomerisierungsdomäne sind ebenfalls sehr konserviert. Die Variation in der Oligomerisierung erhöht die Vielseitigkeit des Transkriptionsapparates und trägt damit zur Modulation der Genexpression bei.

Transkriptionsfaktoren wirken als Aktivatoren oder Repressoren der Genexpression, je nachdem ob sie die Expression ihrer Zielgene stimulieren oder inhibieren. Diese Aktivitäten haben ihre Ursache in den Unterschieden innerhalb der Transkriptionsregulordomäne. Repression der Genexpression könnte durch kompetitive Bindung von Transkriptionsfaktoren an dasselbe *cis*-Element hervorgerufen werden. Andere mögliche Mechanismen wären die Maskierung der Transkriptionsregulordomäne durch Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren oder die Interaktion von Repressordomänen mit Transkriptionsfaktoren. Aktivierungsdomänen beinhalten oft saure Aminosäuren, Prolin oder Glutamin. Untersuchungen an der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors C1 aus Mais zeigten, dass nur eine saure Aminosäure (Aspartat 256) essentiell für die Funktion und eine weitere Aminosäure (Leucin 253) an der Aktivierung der Transkription beteiligt ist (Sainz *et al.*, 1997). In aktiven Repressoren der Transkription wurde ein konserviertes Sequenzmotiv (L/FDLNL/F(x)P) gefunden, welches EAR- (*ERF-associated amphiphilic repression*) Motiv genannt wurde (Ohta *et al.*, 2001). Dieses Motiv wurde inzwischen auch in Zinkfinger-Proteinen (ZAT10, ZAT11 und ZAT12), in AtMYB4, in Aux/IAA-Proteinen der Auxin-Signaltransduktion, in dem an der Blütenentwicklung beteiligten SUPERMAN-Protein und in den an der Pathogenresistenz beteiligten Proteinen NIMIN1 (*NIM1 Interacting1*) und NRR (*Negative Regulator of Resistance*) gefunden (Kazan, 2006). Die transkriptionellen Repressoren der TIA-Biosynthese ZCT1, ZCT2 und ZCT3 aus *C. roseus* besitzen ebenfalls ein EAR-Motiv.

Das Kernlokalisierungssignal variiert stark in der Sequenz, der Organisation und in der Anzahl bei pflanzlichen Transkriptionsfaktoren. Generell wird es durch eine gehäufte Anzahl der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin charakterisiert. Einige Transkriptionsfaktoren besitzen auch kein eigenes Kernlokalisierungssignal und gelangen möglicherweise durch Dimerisierung mit Proteinen, die ein Kernlokalisierungssignal besitzen, in den Zellkern (Goldfarb & Lewandowska, 1994).

Die Genomsequenzierungen der pflanzlichen Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), Reis (Yu *et al.*, 2002; Goff *et al.*, 2002) und der Pappel (*Populus trichocarpa*, Tuskan *et al.*, 2006) macht einen Vergleich der in diesen Spezies

vorkommenden Transkriptionsfaktoren möglich. Im Genom von *A. thaliana* wurden insgesamt 1922 Transkriptionsfaktoren identifiziert, die in 64 Familien eingeteilt werden (Guo *et al.*, 2005). Damit codieren ~7 % der schätzungsweise 25.500 Gene in *A. thaliana* für Transkriptionsfaktoren, was die Bedeutung der transkriptionellen Regulation der Genexpression für die Pflanzenzelle zeigt. Die größten Familien von Transkriptionsfaktoren in Pflanzen sind die AP2/ERF- (APETALA2/*Ethylene response factor*), die bHLH- (*basic helix-loop-helix*), die MYB-, die MADS-, die C₂H₂-Zinkfinger-, die C₂C₂-Zinkfinger-, die NAC-, die WRKY- und die bZIP- (*basic leucine zipper*) Familien. Die **Tabelle 1.1** zeigt die ungefähre Anzahl ihrer Mitglieder in den Spezies *Arabidopsis*, *P. trichocarpa* und Reis (*Oryza sativa* ssp. *indica* und ssp. *japonica*).

Tab. 1.1: Die größten Familien pflanzlicher Transkriptionsfaktoren und die Anzahl ihrer Mitglieder in *A. thaliana*, der Pappel (*Populus trichocarpa*) und Reis (*Oryza sativa* ssp. *indica* und *japonica*). ¹⁾Gesamtanzahl der 4 Unterfamilien Co-like, DOF, GATA und YABBY. Daten aus: PlantTFDB (Guo *et al.*, 2008; <http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>)

Transkriptionsfaktor	Anzahl in <i>A. thaliana</i>	Anzahl in <i>P. trichocarpa</i>	Anzahl in <i>O. sativa</i> ssp. <i>indica</i> / <i>japonica</i>
Gesamtanzahl	1922	2576	2025/2384
AP2/ERF	146	212	174/182
WRKY	71	104	111/113
MYB	150	216	136/138
bHLH	127	148	157/184
bZIP	74	85	88/109
C ₂ C ₂ -Zinkfinger ¹⁾	104	126	97/125
C ₂ H ₂ -Zinkfinger	134	81	94/113
NAC	107	172	157/149
MADS	104	111	70/83

In nahezu allen großen Familien der Transkriptionsfaktoren befinden sich Mitglieder, die an der Stressantwort der pflanzlichen Zelle, der durch Phytohormone regulierten Genexpression oder an der Kontrolle des Sekundärstoffwechsels beteiligt sind. Näher eingegangen wird hier auf die Familien der AP2/ERF-, WRKY-, MYB-, bHLH- und bZIP-Transkriptionsfaktoren.

Die Familie der **AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren** stellt eine sehr große Genfamilie pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktoren mit allein 146 identifizierten Mitgliedern in *A. thaliana* (Riechmann & Meyerowitz, 1998; Riechmann *et al.*, 2000) dar. Sie ist durch das

Vorhandensein der 58-59 Aminosäuren großen AP2-DNA-Bindungsdomäne charakterisiert. Der erste Transkriptionsfaktor der AP2/ERF-Familie wurde durch Klonierung des mutierten Gens in der *A. thaliana* Mutante *apetala2* entdeckt. Überraschenderweise besaß dieses Protein keine MADS-Domäne, wie die bisher bekannten Blütenorganidentitätsregulatoren, sondern ein 68 Aminosäuren langes DNA-Bindungsmotiv, das AP2-Domäne genannt wurde (Jofuku *et al.*, 1994). Kurz darauf wurde dieses Motiv in vier DNA-bindenden Proteinen gefunden, welche an die GCC-Box in der Promoterregion von durch Ethylen induzierbaren PR- (*pathogenesis-related*) Gene binden (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). Diese Proteine wurden zunächst EREBP (*ethylene-responsive element binding protein*) genannt und später in ERF (*ethylene response factor*) umbenannt. Aus der Tomate wurden drei Transkriptionsfaktoren Pti (*Pto-interacting*) 4, 5 und 6 entdeckt, die eine Rolle in der Resistenz gegenüber der bakteriellen Fleckenkrankheit spielen und im *Yeast Two-Hybrid System* mit der Pto- (*Pseudomonas tomato resistance*) Kinase interagieren (Zhou *et al.*, 1997). Sie besitzen Ähnlichkeit zu den EREBPs und binden ebenfalls an die GCC-Box in der Promoterregion von PR-Genen. In *C. roseus* regulieren die ORCA- (*octadecanoid-derivative responsive Catharanthus AP2-domain*) Proteine die Terpenindolalkaloid- (TIA-) Biosynthese durch Bindung an das JERE (*jasmonate- and elicitor-responsive element*) in den Promotoren der biosynthetischen Genen Strictosidin-Synthase (*Str*) und Tryptophan-Decarboxylase (*Tdc*) (Menke *et al.*, 1999b; van der Fits & Memelink, 2000 und 2001).

Anhand der Anzahl der DNA-Bindungsdomänen werden die AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren in drei Unterfamilien eingeteilt: die AP2-, die ERF- und die RAV-Unterfamilie. In der ERF-Unterfamilie wird zusätzlich noch zwischen den ERF- und den CBF/DREB-Proteinen differenziert.

Die Mitglieder der **AP2-Unterfamilie** besitzen zwei AP2-DNA-Bindungsdomänen und regulieren Entwicklungsprozesse, wie die Blütenorganidentität oder die Festlegung von Blattepidermiszellen. Zu ihnen gehören z. B. AP2 (APETALA2), ANT (AINTEGUMENTA) und LEP (LEAFY PETIOLE) aus *A. thaliana*, BBM (BABY BOOM) aus *Brassica napus* sowie G15 (Glossy15) und IDS1 (INDETERMINATE SPIKELET1) aus Mais (Jofuku *et al.*, 1994; Elliott *et al.*, 1996; Klucher *et al.*, 1996; van der Graaff *et al.*, 2000; Boutilier *et al.*, 2002; Moose & Sisco, 1996; Chuck *et al.*, 1998). Das DNA-Bindungsmotiv von ANT ist wesentlich länger als die *cis*-Elemente der ERF- und CBF/DREB-Proteine, welche nur eine DNA-Bindungsdomäne besitzen. Außerdem sind beide AP2-Domänen für die DNA-Bindung nötig, was eine gleichzeitige Bindung beider AP2-Domänen an das DNA-Bindungsmotiv wahrscheinlich macht (Nole-Wilson & Krizek, 2000). Neuere Ergebnisse zeigten außerdem,

dass die Expression von AP2 durch Hemmung der Translation durch die microRNA 147 reguliert wird (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004).

Die **RAV- (*related to ABI3/VP1*) Unterfamilie** ist durch zwei verschiedene DNA-Bindungsdomänen gekennzeichnet. Neben der AP2-Domäne besitzen sie eine zusätzliche B3-Domäne, wie sie auch in VP1 (Viviparous1) und ABI3 (*ABA-insensitive3*) vorkommt. RAV1 bindet an ein zweigeteiltes DNA-Sequenzmotiv mit den Konsensussequenzen CAACA und CACCTG, die im Abstand und in der relativen Orientierung zueinander variieren können (Kagaya *et al.*, 1999). Für CaRAV1 aus *Capsicum annuum* wird eine Beteiligung an der Pathogenresistenz während der inkompatiblen Interaktion mit *Xanthomonas* vermutet (Kim *et al.*, 2005; Sohn *et al.*, 2006).

Die ERF- und CBF/DREB-Proteine der AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren haben nur eine einzige DNA-Bindungsdomäne. Sie spielen eine Rolle bei der Antwort der Pflanzen auf zahlreiche Arten von abiotischem und biotischem Stress.

Mitglieder der **ERF-Unterfamilie** binden an die GCC-Box in den Promotoren von Ethylen-induzierbaren PR-Genen. Zu ihnen gehören EREBP1-4 aus Tabak (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995), AtEBP (Büttner & Singh, 1997), ERF1 (Solano *et al.*, 1998) und AtERF1-15 aus *A. thaliana* (Okamura *et al.*, 1997; Fujimoto *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2001; Oñate-Sánchez & Singh, 2002) sowie Pti4-6 (Zhou *et al.*, 1997). Die Meisten von ihnen sind transkriptionelle Aktivatoren. Es wurden aber auch aktive Repressoren identifiziert (Fujimoto *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2000; McGrath *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Ihnen gemeinsam ist ein konserviertes Sequenzmotiv (L/FDLNL/F(x)P), welches als EAR- (*ERF-associated amphiphilic repression*) Motiv bezeichnet wurde (Ohta *et al.*, 2001).

Die Mitglieder der **CBF/DREB-Unterfamilie** sind an der Signaltransduktion bei Kälte- und Trockenstress sowie Salzstress beteiligt. Sie binden an das *C-repeat* (CRT) und das *dehydration-responsive element* (DRE) mit der gemeinsamen Kernsequenz CCGAC. Dasselbe *cis*-Element wird auch als LTRE (*low-temperature-responsive element*) bezeichnet. Der erste Transkriptionsfaktor der CBF/DREB-Unterfamilie wurde durch einen *Yeast One-Hybrid* Ansatz identifiziert und CBF1 (*CRT/DRE binding factor 1*) genannt (Stockinger *et al.*, 1997; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). Parallel wurden mit der gleichen Methode zwei konservierte Gruppen von CBF/DREB-Proteinen, DREB1 und DREB2, gefunden (Liu *et al.*, 1998). Die Expression der DREB1-Proteine wird durch Kältestress induziert, während die Transkription der DREB2-Proteine durch Trocken- und Salzstress aktiviert wird (Sakuma *et al.*, 2002). Weitere Mitglieder der CBF/DREB-Unterfamilie sind ABI4 (*ABA-insensitive4*) (Finkelstein *et al.*, 1998), TINY (Wilson *et al.*, 1996) und TINY2 (Wei *et al.*, 2005).

Durch Gelretardationsassays wurde gezeigt, dass die Sequenz A/GCCGAC das Kernelement des DRE ist, wobei das vierte C, das fünfte G und das siebte C (TACCCGACAT) essentiell für die spezifische Bindung der DREB-Proteine ist (Sakuma *et al.*, 2002). Das Kernelement der GCC-Box ist die Sequenz GCCGCC und das zweite G, das fünfte G und das siebte C (AGCCGCC) sind in der spezifischen Interaktion mit den ERF-Proteinen involviert (Hao *et al.*, 1998).

Mittels NMR (*nuclear magnetic resonance*) wurde die dreidimensionale Struktur des DNA-Protein-Komplexes der DNA-Bindungsdomäne von AtERF1 bestimmt (Allen *et al.*, 1998). Die DNA-Bindungsdomäne besteht aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt und einer α -Helix, die als Monomer an die GCC-Box bindet. Die Interaktion mit der DNA erfolgt über das β -Faltblatt und stellt einen neuen Mechanismus der DNA-Protein-Interaktion dar. Das β -Faltblatt kontaktiert dabei die große Furche des DNA-Doppelstranges und die konservierten Arginin- und Tryptophan-Reste interagieren spezifisch mit acht der neun aufeinander folgenden Basen, während sie gleichzeitig an das Zuckerphosphatrückrad binden. Die Modellierung der DNA-Bindungsdomäne von CBF1 ergab dieselbe Anordnung der Sekundärstrukturelemente wie in AtERF1 (Allen *et al.*, 1998).

Ursprünglich wurde angenommen, dass die AP2-DNA-Bindungsdomäne spezifisch für Pflanzen ist, da im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsfaktorfamilien wie z. B. bHLH, MADS, Homeobox oder Zinkfingerproteine keine Homologen in tierischen Organismen gefunden wurden. In neueren Untersuchungen wurden jedoch AP2-Domänen in bifunktionalen Proteinen zusammen mit einer Endonuklease-Domäne als Teil eines genetisch mobilen Elements in dem Ciliaten *Tetrahymena thermophila*, dem Cyanobakterium *Trichodesmium erythraeum* und den Viren *Enterobacteria phage RB49* und *Bacteriophage Felix 01* entdeckt (Wuitschick *et al.*, 2004; Magnani *et al.*, 2004). Evolutionär haben sich die AP2/ERF-Proteine in Pflanzen höchst wahrscheinlich durch lateralen Gentransfer des Endonuklease-AP2 Gens von Prokaryonten zu Pflanzen entwickelt. Dafür sprechen auch die fehlenden Introns in den meisten AP2/ERF-Proteinen. Wahrscheinlich erfolgte dieser laterale Gentransfer zum Zeitpunkt der Evolution der Chlorplasten durch Endosymbiose eines ancestralen Cyanobakteriums und der folgenden Verschiebung der cyanobakteriellen Gene in das pflanzliche Kerngenom. Dabei wurde die potentiell schädliche Endonukleaseaktivität inaktiviert und ging verloren, während die AP2-Domäne zum Vorläufer der AP2/ERF-Domänen der heutigen Landpflanzen wurde (Magnani *et al.*, 2004).

Die **WRKY-Transkriptionsfaktoren** sind an der Regulation mehrerer pflanzenspezifischer physiologischer Programme beteiligt, u. a. der Pathogenabwehr, der Trichomentwicklung und der Seneszenz. Trotz der hohen Konservierung ihrer DNA-Bindungsdomäne, sind die WRKY-Proteine in ihrer gesamten Struktur sehr divergent und werden in drei Gruppen eingeteilt, welche ihrer verschiedenen Funktionen entsprechen könnte (Eulgem *et al.*, 2000).

Die ca. 60 Aminosäuren lange WRKY-Domäne enthält das konservierte Heptapeptid WRKYGQK und ein Zinkfinger-ähnliches Motiv und ist für die sequenzspezifische DNA-Bindung verantwortlich. Alle bekannten WRKY-Transkriptionsfaktoren besitzen entweder eine oder zwei WRKY-Domänen. Ihre Einteilung erfolgt aufgrund der Anzahl der WRKY-Domänen und der Eigenschaften ihres Zinkfinger-ähnlichen Motivs. WRKY-Transkriptionsfaktoren binden an das W-Box Element (T)(T)TGAC(C/T).

Die WRKY-Transkriptionsfaktoren wurden ebenfalls für pflanzenspezifisch gehalten, bis vor kurzem WRKY-Proteine mit zwei WRKY-Domänen in den Genomen zweier nicht-pflanzlichen Eukaryonten, dem einzelligen Protisten *Giardia lamblia* und dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* gefunden wurden (Zhang & Wang, 2005). Ein Gen für ein WRKY-Protein wurde auch in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* identifiziert und es wird angenommen, dass die C-terminale WRKY-Domäne der Ursprung für die WRKY-Transkriptionsfaktoren mit nur einer DNA-Bindungsdomäne ist.

Die große Familie der **MYB-Transkriptionsfaktoren** ist durch die konservierte MYB DNA-Bindungsdomäne gekennzeichnet. Das erste identifizierte MYB-Gen war das Proto-Onkogen *v-Myb* des AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*). Die drei mit *v-Myb* verwandten Gene *c-Myb*, *A-Myb* und *B-Myb* wurden daraufhin in vielen Wirbeltieren gefunden und regulieren die zelluläre Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Homologe Gene wurden ebenso in Insekten, Pilzen und Schleimpilzen identifiziert. Der erste isolierte pflanzliche MYB-Transkriptionsfaktor war C1 aus Mais, ein Regulator der Anthocyaninbiosynthese (Paz-Ares *et al.*, 1987). Die MYB-Domäne besteht aus einem Motiv von ca. 53 Aminosäuren, welches hintereinander in bis zu drei unvollkommenen Wiederholungen vorkommt. Sie nimmt eine *Helix-turn-Helix*-Konformation ein, welche mit der großen Furche des DNA-Doppelstranges interkaliert. Die drei Wiederholungen in c-MYB wurden als R1, R2 und R3 benannt und dienen der Bezeichnung der Wiederholungen in anderen MYB-Proteinen. Die pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren werden in drei Gruppen eingeteilt. Die größte und am besten untersuchte Gruppe ist R2R3-MYB mit zwei Wiederholungen des MYB-Motivs. Proteine mit drei Wiederholungen werden als MYB3R und solche mit nur einem Motiv als MYB1R oder MYB-like bezeichnet. MYB3R-Faktoren sind, wie ihre Homologe in Tieren, auch in Pflanzen

an der Zellzykluskontrolle beteiligt, indem sie die Transkription der Cyclin-Gene regulieren (Ito *et al.*, 2001). Einige MYB1R-Faktoren sind an der Kontrolle des circadianen Rhythmus beteiligt (Wang *et al.*, 1997; Schaffer *et al.*, 1998). Die Transkriptionsfaktoren vom R2R3-MYB Typ, die bisher nur in Pflanzen identifiziert wurden, sind an der Regulation vielfältiger pflanzen-spezifischer Prozesse in der Entwicklung, der Stressantwort auf umweltbedingte Einflüsse und Pathogene, der Vermittlung von Phytohormonwirkungen und der Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels beteiligt (Stracke *et al.*, 2001).

Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang die Regulation des Phenylpropanoid-metabolismus und die Funktion in der Pathogenabwehr durch MYB-Transkriptionsfaktoren. NtMYB2, ein durch Elicitoren und Verwundung induzierter R2R3-MYB, reguliert die Expression von Verteidigungsgenen in Tabak (Sugimoto *et al.*, 2000) und die Expression eines *AtMYB78*-ähnlichen MYB-Gens aus Reis wird durch Pilzbefall und Jasmonsäure induziert (Lee *et al.*, 2001). Die Überexpression von *AtMYB75/PAP1* (PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1) in *A. thaliana* resultiert in der Akkumulation von Anthocyaninen (Borevitz *et al.*, 2000). *AtMYB4* ist ein negativer Regulator der Phenylpropanoidbiosynthese und reguliert die Synthese von Sinapatestern, welche die Pflanze vor UV-B Strahlung schützen (Jin *et al.*, 2000). *AtMYB34/ATR1* (ALTERED TRYPTOPHAN REGULATION 1) ist ein positiver Regulator der Tryptophanbiosynthese durch Aktivierung der Anthranilat-Synthase Genexpression (Bender & Fink, 1998).

Die **bHLH** (*basic region/helix-loop-helix*) **Proteine** bilden eine sehr große Familie von Transkriptionsfaktoren (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2003), die in nicht-pflanzlichen Eukaryonten und speziell in Säugertieren bereits gut untersucht ist. Die bHLH-Domäne, welche die Transkriptionsfaktorfamilie definiert, umfasst etwa 60 Aminosäuren mit zwei funktionell unterschiedlichen Regionen. Die basische Region am N-terminalen Ende der Domäne ist an der DNA-Bindung beteiligt und besteht aus fünfzehn Aminosäuren, von denen viele basische Reste tragen. Die *Helix-Loop-Helix* Region am C-terminalen Ende fungiert als Dimerisierungsdomäne. Sie ist aus vielen hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, die zwei amphipathische Helices bildet, welche durch eine in der Sequenz und Länge variable Schleife getrennt werden. Abgesehen von der konservierten bHLH-Domäne zeigen die bHLH-Proteine eine erhebliche Sequenzdivergenz. Co-Kristallisationsstudien ergaben, dass die Interaktion der *Helix-Loop-Helix* Regionen zweier Proteine zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren führt, von denen jeder Partner die Hälfte der DNA-Erkennungssequenz bindet. Das DNA-Kernsequenzmotif, welches die bHLH-Transkriptionsfaktoren erkennen, ist die als E-Box bezeichnete Hexanukleotidkonsensussequenz

(CANNTG). Es gibt verschiedene Typen der E-Box, abhängig von den beiden zentralen Basen. Die häufigste ist die palindromische G-Box (CACGTG). Spezielle konservierte Aminosäuren in der basischen Region sorgen für die Erkennung der Kernkonsensussequenz, während andere Reste die Spezifität für einen Typ von E-Box Motiven bestimmen. Die flankierenden Nukleotide außerhalb der Hexanukleotidsequenz spielen eine zusätzliche Rolle bei der Bindungsspezifität und ein Rest in der Schleifenregion bindet ebenfalls die DNA außerhalb der Kernerkennungssequenz.

Das erste entdeckte pflanzliche Protein mit einem bHLH-Motiv, war Lc aus Mais, welches an der Kontrolle der Anthocyaninbiosynthese beteiligt ist (Ludwig *et al.*, 1989). AtMYC2 spielt eine zentrale Rolle bei der Modulation der JA-vermittelten Signaltransduktion, indem er die Transkription von mehreren Transkriptionsfaktorgenen steuert, welche dann die Expression der JA-abhängigen Antwortgene regulieren (Dombrecht *et al.*, 2007). Der bHLH-Transkriptionsfaktor CrMYC1 aus *C. roseus* bindet an die G-Box im Promoter der Strictosidin-Synthase und ist wahrscheinlich an dessen Elicitor- und JA-induzierten Expression regulativ beteiligt (Chatel *et al.*, 2003).

Die Familie der **bZIP- (*basic region/leucine zipper*) Transkriptionsfaktoren** ist durch das Vorhandensein des bZIP-Motivs charakterisiert (Jakoby *et al.*, 2002). Dieses zweiteilige DNA-Bindungsmotiv besteht aus einer Region mit vielen basischen Aminosäuren und einem Motiv, das im regelmäßigen Abstand von sieben Aminosäuren mehrere Leucinreste enthält und eine amphipathische Helix bildet. Während die basische Region direkt an die DNA bindet, vermittelt die Interaktion der hydrophoben Dimerisierungsstellen der zwei α -Helices die Bildung von Homo- und Heterodimeren, aus der eine *Coiled-Coil* Struktur resultiert, die *Leucine Zipper* genannt wird. Die bZIP-Proteine wurden in allen bisher untersuchten Eukaryonten identifiziert und sind sehr gut in tierischen Systemen untersucht. Interessanterweise besitzt *Arabidopsis* ungefähr viermal so viele bZIP-Proteine wie die Hefe, *C. elegans* oder *Homo sapiens*. In Pflanzen regulieren die bZIP-Transkriptionsfaktoren diverse Prozesse wie die Pathogenabwehr, Licht- und Stress-Signaltransduktion, die Samenreifung und die Blütenentwicklung. Die DNA-Bindung erfolgt an *cis*-Elemente mit der Kernsequenz ACGT, wie der G-Box (CACGTG). Die ABF- (*ABRE binding factor*) und die AREB- (*ABA-responsive element binding*) Proteine binden an Promotoren, die das ABRE (*ABA response element*) enthalten und spielen eine Rolle in der ABA- (Abscisinsäure) und abiotischen Stress-Signaltransduktion. Die TGA-Transkriptionsfaktoren regulieren die durch Salicylsäure vermittelte Expression der PR-Gene durch Bindung an das *as-1* Element und Interaktion mit dem NPR-Protein, welches selbst nicht an die DNA bindet. AtbZIP57/OBF4/TGA4

interagiert mit AtEBP, der an die GCC-Box bindet, die in der Promoterregion vieler PR-Gene vorkommt (Büttner & Singh, 1997).

1.4 Die Biosynthese der Benzo[c]phenanthridinalkaloide

Die Benzylisochinolinalkaloide stellen eine große Gruppe innerhalb der Naturstoffe mit mehr als 2.500 bekannten Verbindungen dar (Facchini, 2001; Ziegler & Facchini, 2008). Zu ihnen gehören auch die Benzo[c]phenanthridinalkaloide mit nahezu 80 bekannten, natürlich existierenden Substanzen (Krane *et al.*, 1984). Ihr Vorkommen ist größtenteils auf die drei Pflanzenfamilien der Papaveraceae (z. B. *Argemone*, *Chelidonium*, *Dicranostigma*, *Eschscholzia*, *Glaucium*, *Hunnemannia*, *Macleaya*, *Papaver*, *Sanguinaria*), Fumariaceae (z. B. *Corydalis*, *Fumaria*) und Rutaceae (z. B. *Zanthoxylum*) beschränkt (Krane *et al.*, 1984; Preininger, 1986; Dostál & Potáček, 1990). Für *E. californica* wurde das Vorkommen von Chelerythrin, Chelilutin, Chelirubin, Sanguinarin, Dihydrosanguinarin, Norsanguinarin, Oxysanguinarin und Macarpin beschrieben (Krane *et al.*, 1984; Preininger, 1986). Des Weiteren wurden in Zellkulturen von *E. californica* die hydroxylierten Zwischenprodukte 10-Hydroxysanguinarin, 10-Hydroxydihydrosanguinarin, Dihydrochelirubin, 12-Hydroxychelirubin, 12-Hydroxydihydrochelirubin, Dihydromacarpin, Dihydrochelerythrin und 10-Hydroxychelerythrin nachgewiesen (Tanahashi & Zenk, 1990 a). Eine gute Übersicht der in der Pflanze und in Zellkulturen von *E. californica* identifizierten Benzo[c]phenanthridinalkaloide ist in der Dissertation von D. Weiß enthalten (Weiß, 2004).

Die Biosynthese der Benzo[c]phenanthridinalkaloide ist, ebenso wie die der Berberin-Biosynthese, auf enzymatischer Ebene vor allem durch die Verwendung von Suspensionszellkulturen vollständig aufgeklärt (Kutchan & Zenk, 1993; Zenk, 1994; Kutchan, 1998). Sie ist mit zweiundzwanzig Reaktionsschritten einer der längsten bekannten Biosynthesewege, von denen sieben Schritte von Cytochrom-P450-Enzymen und weitere sechs von Methyltransferasen katalysiert werden. Die Biosynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen. Bis zum zentralen Intermediat (S)-Retikulin verläuft die Biosynthese aller Benzylisochinolinalkaloide identisch, danach verzweigen sich die Synthesewege in Richtung der Benzo[c]phenanthridin-, Protoberberin- und Morphinan-Alkaloide (siehe **Abb. 1.4**). Deshalb eignet sich *E. californica* auch als Modell für die Benzylisochinolinalkaloid-Biosynthese in anderen Spezies wie z. B. *P. somniferum*. Auch wenn *E. californica* nicht in der Lage ist Morphinan-Alkaloide wie Codein und Morphin zu synthetisieren, so sind doch Teile der Biosynthese identisch. Außerdem steht in *P. somniferum* der Stoffwechselweg der

Benzo[*c*]phenanthridine in direkter Konkurrenz zur Morphinanbiosynthese, da beide vom (*S*)-Retikulin ausgehen.

Mit der Einführung der molekularbiologischen Methoden in den 1990iger Jahren zur Untersuchung der Alkaloidbiosynthese gelangen die ersten Klonierungen biosynthetischer Gene. Für die frühen enzymatischen Schritte bis zum (*S*)-Retikulin, wurden bereits zahlreiche cDNAs aus den Spezies *C. japonica*, *E. californica*, *P. somniferum* und *T. flavum* kloniert. Ebenso wurden mehrere cDNAs für das Berberinbrückenzym, das erste Enzym der Benzo[*c*]phenanthridin-, bzw. der Protoberberin-spezifischen Verzweigung, isoliert (Dittrich & Kutchan, 1991; Facchini *et al.*, 1996 b; Chou & Kutchan, 1998; Samanani *et al.*, 2005).

Die Biosynthese der Benzyloisochinolinalkaloide leitet sich aus dem Primärstoffwechsel von der Aminosäure L-Tyrosin ab. Sie beginnt mit der Kondensation von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd (4-HPAA) zu dem dreifach hydroxylierten (*S*)-Norcoclaurin (Stadler *et al.*, 1987). Dopamin, welches den Isochinolinrest liefert, kann auf zwei Wegen synthetisiert werden. Entweder erfolgt die Umsetzung von L-Tyrosin über Tyramin oder über L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) zu Dopamin (Rueffer & Zenk, 1987 a). In beiden Fällen sind jeweils eine Decarboxylase und eine Phenoloxidase an den Reaktionen beteiligt. Der Benzylrest der Benzyloisochinolinalkaloide entstammt dem 4-HPAA, welches durch Transaminierung von L-Tyrosin zu 4-Hydroxyphenylpyruvat und anschließende Decarboxylierung entsteht (Rueffer & Zenk, 1987 a). Aus *P. somniferum* wurden bereits mehrere cDNAs für die Tyrosin-/DOPA-Decarboxylase kloniert (Facchini & De Luca, 1994 und 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 1996). Im tetraploiden Genom von *P. somniferum* handelt es sich dabei um eine kleine Familie mit circa 15 Genen, die eine differentielle Regulation zeigen und aufgrund ihrer Sequenzidentität in zwei Untergruppen eingeteilt werden (Facchini & De Luca, 1994). Eine Phenoloxidase wurde mittels Affinitätschromatographie aus dem Latex von *P. somniferum* gereinigt, jedoch nur partial charakterisiert (Bilka *et al.*, 2000). Die Kondensation von Dopamin und 4-HPAA zu (*S*)-Norcoclaurin wird durch die (*S*)-Norcoclaurin-Synthase (NCS) katalysiert. Ursprünglich wurde das Enzym als (*S*)-Norlaudanosolin-Synthase bezeichnet, weil es sowohl 4-Hydroxyphenylacetaldehyd als auch 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd als Substrat akzeptiert. Das Kondensationsprodukt von 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd mit Dopamin ist das vierfach hydroxylierte (*S*)-Norlaudanosolin (Rueffer *et al.*, 1981). Eine partielle Reinigung des Enzyms erfolgte aus *Eschscholzia tenuifolia* Suspensionszellkulturen (Schumacher *et al.*, 1983). Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem (*S*)-Norlaudanosolin und (*S*)-Norcoclaurin ergaben, dass nur (*S*)-Norcoclaurin in die biosynthetisch nachfolgenden Benzyloisochinolinalkaloide inkorporiert wurde. Außerdem

konnte (*S*)-Norlaudanosolin, im Gegensatz zu (*S*)-Norcoclaurin, nie in Pflanzenextrakten analytisch nachgewiesen werden.

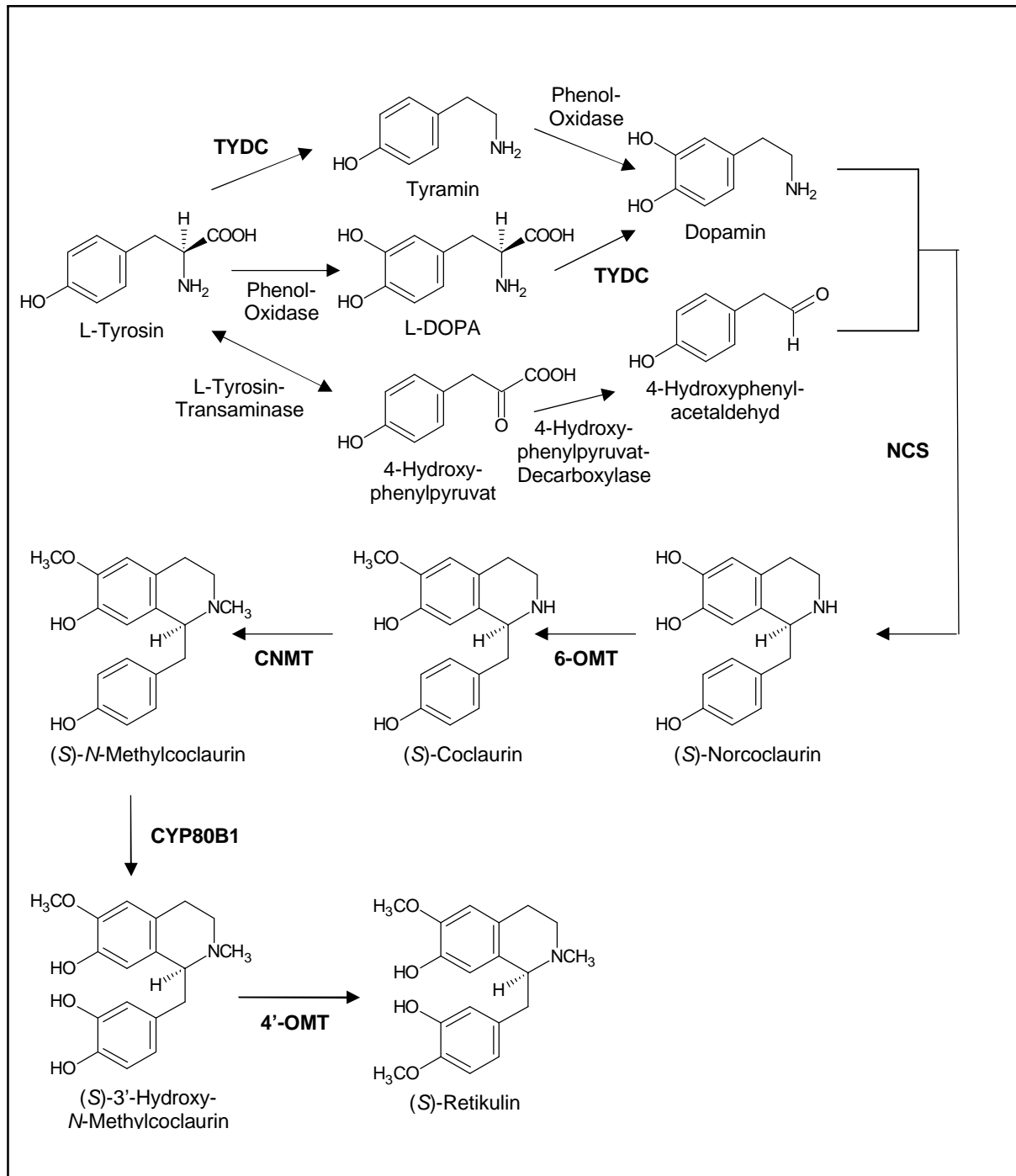


Abb. 1.4: Schema der Biosynthese von (*S*)-Retikulin ausgehend von L-Tyrosin. Enzyme, für die cDNAs isoliert wurden, sind fett gedruckt. Abkürzungen der Enzyme: TYDC, Tyrosin-Decarboxylase; NCS, Norcoclaurin-Synthase; 6-OMT, Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase; CNMT, Coclaurin-*N*-Methyltransferase; CYP80B1, *N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase; 4'-OMT, 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase.

In Folge dieser Korrektur des Biosyntheseweges erfolgte die Umbenennung des Enzyms in die (*S*)-Norcoclaurin-Synthase (Stadler *et al.*, 1987 und 1989; Stadler & Zenk, 1990). Weitere

Reinigungen und Charakterisierungen der (*S*)-Norcoclaurin-Synthase erfolgten aus einer Elicitor-induzierten *P. somniferum* Suspensionszellkultur und einer *T. flavum* Zellkultur (Samanani & Facchini, 2001 und 2002). Inzwischen wurden zwei cDNAs für die (*S*)-Norcoclaurin-Synthase aus *T. flavum* und *P. somniferum* kloniert, die Homologie zu PR10 (*pathogenesis-related*) und Bet v1 Major Allergen Proteinen aufweisen (Samanani *et al.* 2004; Liscombe *et al.*, 2005). Aus *C. japonica* wurde zusätzlich zu einem PR10-Homologen mit Norcoclaurin-Synthase-Aktivität, eine cDNA isoliert, die für eine neue 2-Oxoglutarat-unabhängige Dioxygenase codiert und die Kondensation von Dopamin und 4-HPAA zu (*S*)-Norcoclaurin katalysiert (Minami *et al.*, 2007).

Die weitere Umsetzung von (*S*)-Norcoclaurin zu (*S*)-Retikulin erfolgt in vier Schritten, die durch zwei *O*-Methyltransferasen, eine *N*-Methyltransferase und eine Hydroxylase katalysiert werden. Die Methylierung von (*S*)-Norcoclaurin zu (*S*)-Coclaurin wird durch die (*S*)-Norcoclaurin 6-*O*-Methyltransferase (6-OMT) vermittelt. Eine partielle Reinigung und Charakterisierung der 6-OMT gelang erstmals aus einer *Argemone platyceras* Zellkultur (Rueffer *et al.*, 1983). Für die 6-OMT codierende cDNAs konnten aus *C. japonica* (Morishige *et al.*, 2000), *P. somniferum* (Ounaroon *et al.*, 2003) und *T. flavum* (Samanani *et al.* 2005) isoliert werden. Die *N*-Methylierung zu (*S*)-*N*-Methylcoclaurin wird durch die (*S*)-Coclaurin *N*-Methyltransferase (CNMT) katalysiert (Frenzel & Zenk, 1990 a). Entsprechende cDNAs wurden aus *C. japonica* (Choi *et al.*, 2002), *P. somniferum* (Facchini & Park, 2003) und *T. flavum* (Samanani *et al.* 2005) isoliert. Die sich anschließende Hydroxylierung von (*S*)-*N*-Methylcoclaurin erfolgt durch die (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (CYP80B1), eine Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase, welche zuerst aus *E. californica* kloniert wurde (Pauli & Kutchan, 1998). Aus *E. californica* wurden zwei cDNAs kloniert, die für zwei funktionelle CYP80B1 Isoenzyme codieren. Weitere cDNAs liegen aus *P. somniferum* (Huang & Kutchan, 2000), *C. japonica* (Ikezawa *et al.*, 2003) und *T. flavum* (Samanani *et al.* 2005) vor.

An dieser Stelle verzweigt sich der Stoffwechselweg zu den Bisbenzylisochinolinalkaloiden. Die Berbamunin-Synthase CYP80A1 aus *Berberis stolonifera* katalysiert durch C-*O*-Phenolkupplung die Bildung von Berbamunin aus (*S*)-*N*-Methylcoclaurin und (*R*)-*N*-Methylcoclaurin (Stadler & Zenk, 1993; Kraus & Kutchan, 1995).

Die abschließende 4'-Methylierung von (*S*)-3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin zum (*S*)-Retikulin katalysiert die 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (4'-OMT; Frenzel & Zenk, 1990 b). Für die 4'OMT codierende cDNAs wurden zuerst aus *C. japonica* (Morishige *et al.*, 2000) und später auch aus *P. somniferum* (Facchini & Park, 2003; Ziegler

et al., 2005) und *T. flavum* (Samanani *et al.* 2005) kloniert. Im Genom von *P. somniferum* sind zwei Isoenzyme, 4'-OMT 1 und 4'-OMT 2, codiert (Facchini & Park, 2003), die beide funktionell sind (pers. Mitteil. J. Ziegler).

Die Ausbildung der Berberinbrücke zum (*S*)-Scoulerin erfolgt durch das Berberinbrückenenzym (Rink & Böhm, 1975). Die erste Reinigung und Charakterisierung des Enzyms erfolgte aus einer *Berberis beaniana* Zellkultur (Steffens *et al.* 1985). Die erste Klonierung einer cDNA des Berberinbrückenenzym (BBE) gelang aus *E. californica* (Dittrich & Kutchan 1991). Weitere BBE cDNAs wurden aus *P. somniferum* (Facchini *et al.*, 1996 b), *B. stolonifera* (Chou & Kutchan, 1998) und *T. flavum* (Samanani *et al.* 2005) isoliert. Vom (*S*)-Scoulerin zweigt in *Berberis*, *Coptis* und *Thalictrum* ein weiterer Biosyntheseweg zum Berberin ab. Die Scoulerin-9-*O*-Methyltransferase (SOMT) methyliert das (*S*)-Scoulerin zu (*S*)-Tetrahydrocolumbamin (Sato *et al.*, 1993; Takeshita *et al.*, 1995) Dieses wird durch die (*S*)-Canadin-Synthase (CYP719A1) und die (*S*)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (STOX) zu Berberin umgesetzt.

Für die Biosynthese der Benzo[*c*]phenanthridine müssen zwei Methylendioxybrücken ausgebildet werden. Diese beiden aufeinander folgenden Reaktionen (zuerst am Ring D und anschließend am Ring A des Moleküls) werden durch die beiden Cytochrom-P450-Enzyme (*S*)-Cheilanthifolin-Synthase (CHS) und (*S*)-Stylopin-Synthase (STS) vermittelt (Bauer & Zenk, 1989 und 1991). Eine ähnliche Reaktion katalysiert die (*S*)-Canadin-Synthase (CYP719A1), die aus *C. japonica* kloniert wurde (Ikezawa *et al.*, 2003). Die erste Reinigung des Enzyms erfolgte aus *Thalictrum tuberosum* Zellkulturen und es konnte gezeigt werden, dass es die Bildung der Methylendioxybrücke am Ring A des (*S*)-Tetrahydroberberins katalysiert (Rueffer & Zenk, 1994) Erst kürzlich wurden die beiden cDNAs für CYP719A2 und CYP719A3 aus *E. californica* isoliert. Beide Proteine zeigen Stylopin-Synthase-Aktivität, wobei CYP719A2 nur (*S*)-Cheilanthifolin als Substrat, CYP719A3 dagegen auch Substrate ohne bereits existierende Methylendioxybrücke am Ring D akzeptiert (Ikezawa *et al.*, 2007). Für das Methylendioxybrückenenzym CYP719A4 aus *T. flavum* liegen bisher keine enzymatischen Daten vor (Samanani *et al.*, 2005). Die zweite *N*-Methylierung erfolgt durch die (*S*)-Tetrahydroprotoberberin-(*cis*)-*N*-Methyltransferase (TNMT) und führt zum (*S*)-(cis)-*N*-Methylstylopin. Die TNMT wurde partiell aus Zellkulturen von *E. californica* und *Corydalis vaginans* gereinigt (Rueffer *et al.*, 1990) und aus einer *S. canadensis* Zellkultur isoliert (O'Keefe & Beecher, 1994) und charakterisiert. Die erste cDNA für dieses Enzym wurde vor kurzem in einer *Papaver* EST-Datenbank identifiziert (Liscombe & Facchini, 2007).

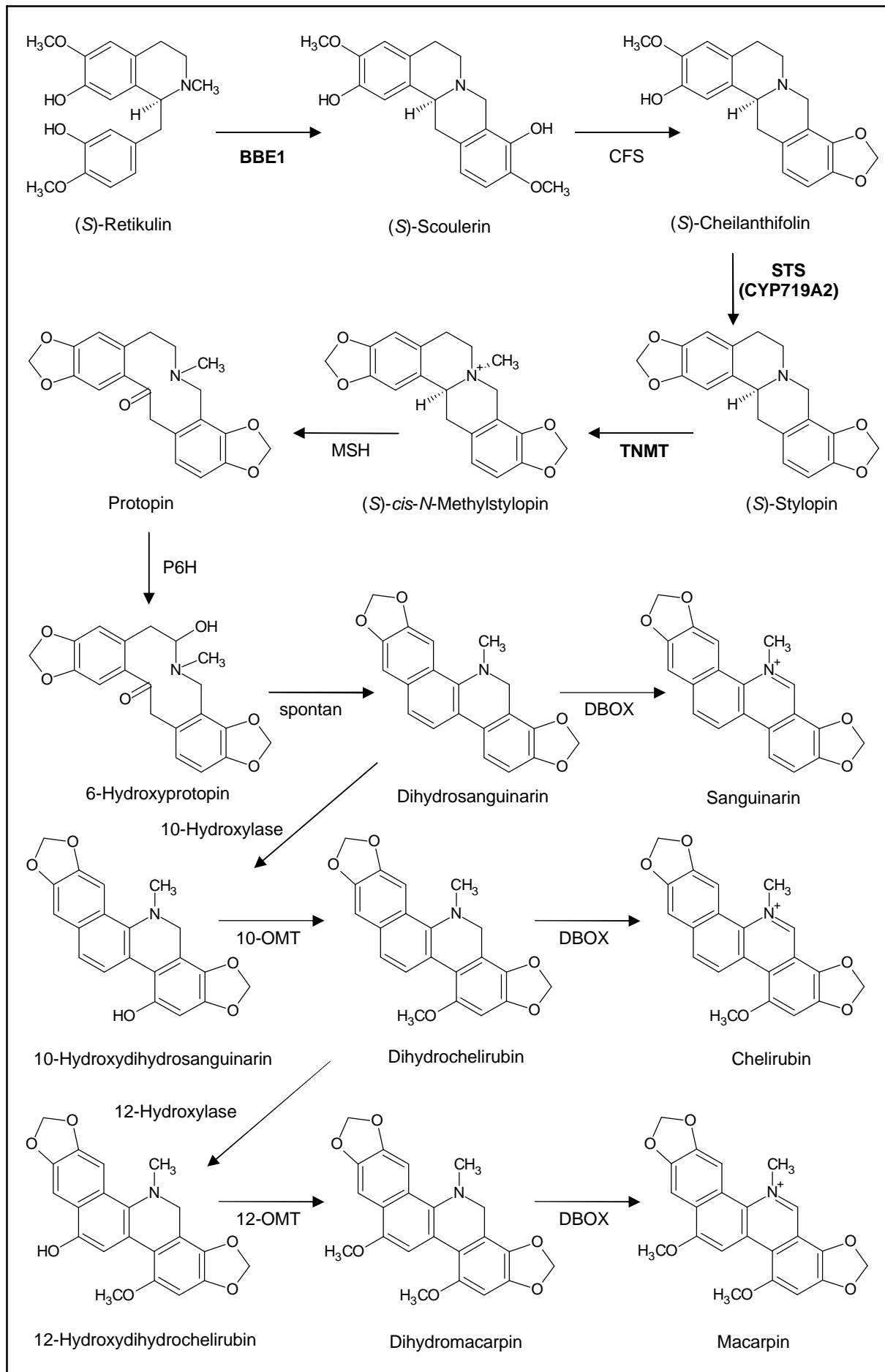


Abb. 1.5: (vorhergehende Seite) Schema der Biosynthese der quaternären Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide Sanguinarin, Chelirubin und Macarpin ausgehend von (*S*)-Retikulin. Enzyme, für die cDNAs isoliert wurden, sind fett gedruckt. Abkürzungen der Enzyme: BBE1, Berberinbrückenenzym; CFS, (*S*)-Cheilanthifolin-Synthase; STS (CYP719A2); (*S*)-Stylopin-Synthase; TNMT, Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase; MSH, *cis-N*-Methylstylopin-Hydroxylase; P6H, Protopin-6-Hydroxylase; DBOX, Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase; 10-Hydroxylase, Dihydrosanguinarin-10-Hydroxylase; 10-OMT, 10-Hydroxydihydrosanguinarin-10-*O*-Methyltransferase; 12-Hydroxylase, Dihydrochelirubin-12-Hydroxylase; 12-OMT, 12-Hydroxydihydrochelirubin-12-*O*-Methyltransferase.

Zwei weitere Cytochrom-P450-Enzyme, die (*S*)-(*cis*)-*N*-Methylstylopin-14-Hydroxylase (MSH) und die Protopin-6-Hydroxylase (P6H), führen die folgenden zwei Hydroxylierungsreaktionen aus (Rueffer & Zenk, 1987 b; Tanahashi & Zenk, 1990 b). Das entstehende 6-Hydroxyprotopin reagiert in einer spontanen Umlagerung zum Dihydrosanguinarin. Durch die alternierende Abfolge von Hydroxylierungs- und Methyltransferase-Reaktionen führt die Biosynthese vom Dihydrosanguinarin über 10-Hydroxydihydrosanguinarin, Dihydrochelirubin und 12-Hydroxydihydrochelirubin zum Dihydromacarpin. Die beteiligten Enzyme sind die beiden Cytochrom-P450-Enzyme Dihydrosanguinarin-10-Hydroxylase und Dihydrochelirubin-12-Hydroxylase sowie die beiden *O*-Methyltransferasen 10-Hydroxydihydrosanguinarin-10-*O*-Methyltransferase und 12-Hydroxydihydrochelirubin-12-*O*-Methyltransferase (De-Eknamkul *et al.*, 1992; Kammerer *et al.*, 1994). Die abschließende Oxidation der Dihydro-Vorstufen zu den quaternären Benzo[*c*]phenanthridinalkaloiden Sanguinarin, 10-Hydroxysanguinarin, Chelirubin, 12-Hydroxychelirubin und Macarpin erfolgt durch die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (DHBO) (Schumacher & Zenk, 1988; Arakawa *et al.*, 1992; Ignatov *et al.*, 1996 und 1997). Für viele Enzyme der späteren Reaktionsschritte liegen bisher noch keine klonierten cDNAs vor. Aus Suspensionszellkulturen von *E. californica* wurde eine bislang unbekannte Sanguinarin-Reduktase gereinigt, welche endogen durch die Zellen produziert sowie extern dem Medium zugesetztes Sanguinarin zu Dihydrosanguinarin umsetzt (Weiss *et al.*, 2006).

Den an der Biosynthese beteiligten Methyltransferasen dient jeweils *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Donor für den Methylgruppentransfer. Aus einer mit MeJA induzierten *T. tuberosum* Zellkultur wurden vier *O*-Methyltransferase-cDNAs isoliert, die für in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnliche Enzyme codieren. Die vier *O*-Methyltransferasen zeigten eine sehr breite Substratspezifität und katalysierten sowohl Methylierungsreaktionen des Benzylisochinolinalkaloid- als auch des Phenylpropanoid-Stoffwechsels (Frick & Kutchan, 1999). Die meisten Cytochrom-P450-Enzyme benötigen für die Übertragung zweier Elektronen vom NADPH die Hilfe der Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) als Elektronen-

donor. Für die CPR codierende cDNAs wurden u. a. aus *Eschscholzia* und *Papaver* kloniert (Rosco *et al.*, 1997). Indirekt an der Biosynthese beteiligt sind auch Transportproteine, welche Intermediate zwischen verschiedenen Kompartimenten oder Endprodukte an ihren Zielort transportieren. In *C. japonica* wurde ein ABC- (*ATP binding cassette*) Transporter entdeckt, welcher Berberin von der Wurzel, dem Ort der Biosynthese, in das Rhizom transportiert (Shitan *et al.*, 2003).

1.5 *Eschscholzia californica* Suspensionszellkulturen als experimentelles System

Eschscholzia californica Cham. (deut. Goldmohn, Kalifornischer Mohn, auch Schlafmützchen; engl. *Californian Poppy*) gehört zur Familie der Papaveraceae (Mohngewächse) und ist nahe mit dem Schlafmohn *P. somniferum* L. verwandt. *E. californica* ist eine einjährige Pflanze mit stark gefiederten, graugrünen Blättern und vier großen, hellgelben bis orangefarbenen Kronblättern, die tagsüber weit offen, aber nachts geschlossen sind. Nach der Befruchtung entwickelt sich eine schotenförmige Kapsel, die bei der Reife in zwei Klappen aufspringt und kleine Samen ausschleudert. *E. californica* enthält im Gegensatz zu den meisten Mohngewächsen keinen Milchsaft (Latex). Die Herkunft liegt in Nordamerika, wo sie besonders in Kalifornien (dort Staatsblume) und weiteren südwestlichen Bundesstaaten der USA (Oregon, Nevada und Washington) bis zur Baja California in Mexiko verbreitet ist. Als beliebte Gartenpflanze mit zahlreichen Farbvarianten ist *E. californica* weit verbreitet und in einigen Teilen der Welt als Unkraut eingebürgert. Ihren wissenschaftlichen Namen erhielt die Pflanze von dem deutschen Dichter und Entdecker Adelbert von Chamisso, der sie während einer Weltumsegelung 1815-1818 (Rurik-Expedition) unter der Leitung von Otto von Kotzebue beschrieb und nach dem deutsch-baltischen Schiffsarzt und Biologen Johann Friedrich von Eschscholz benannte. Ein Schreibfehler, in dem *Eschscholzia* zu *Eschscholtzia* wurde, fand weite Verbreitung in der wissenschaftlichen Literatur und die falsche Schreibweise wird teilweise bis heute gebraucht.

E. californica findet als Heilpflanze Anwendung in der traditionellen Medizin. Verwendet werden die getrockneten, oberirdischen Teile der Pflanze (*Eschscholziae herba*). Die Droge oder ihre Zubereitungen werden gegen leichte Einschlafstörungen bei Erwachsenen und Kindern, bei Angstzuständen, leichten nervösen Störungen, Nervenschmerzen und Leber- sowie Gallenleiden verwendet. Unter dem Namen Phytonoxon N (Steigerwald) ist auch ein ethanolischer Extrakt aus *Eschscholzia californica* (80 %) und *Corydalis cava* (20 %) im

Handel erhältlich. Die Nordamerikanischen Indianer nutzten den Latex traditionell gegen Zahnschmerzen und Ektoparasiten (van Wyk *et al.*, 2003). *E. californica* enthält zahlreiche Benzylisochinolinalkaloide (siehe **Abb. 1.6**), die wahrscheinlich für die pharmakologische Wirkung verantwortlich sind. Der Alkaloidgehalt liegt in den oberirdischen Teilen bei 0,5-1,2 %, in den Wurzeln mit mindestens 2 % jedoch deutlich höher. Die Hauptalkaloide in den Blättern sind Pavine (Californidin und Eschscholzin), ferner Protopinalkaloide sowie Spuren von Benzo[*c*]phenanthridin- und Aporphinalkaloiden. In den Wurzeln bilden jedoch die Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide wie Chelerythrin und Sanguinarin gemeinsam mit Allocryptopin und Protopin die Hauptalkaloide (van Wyk *et al.*, 2003).

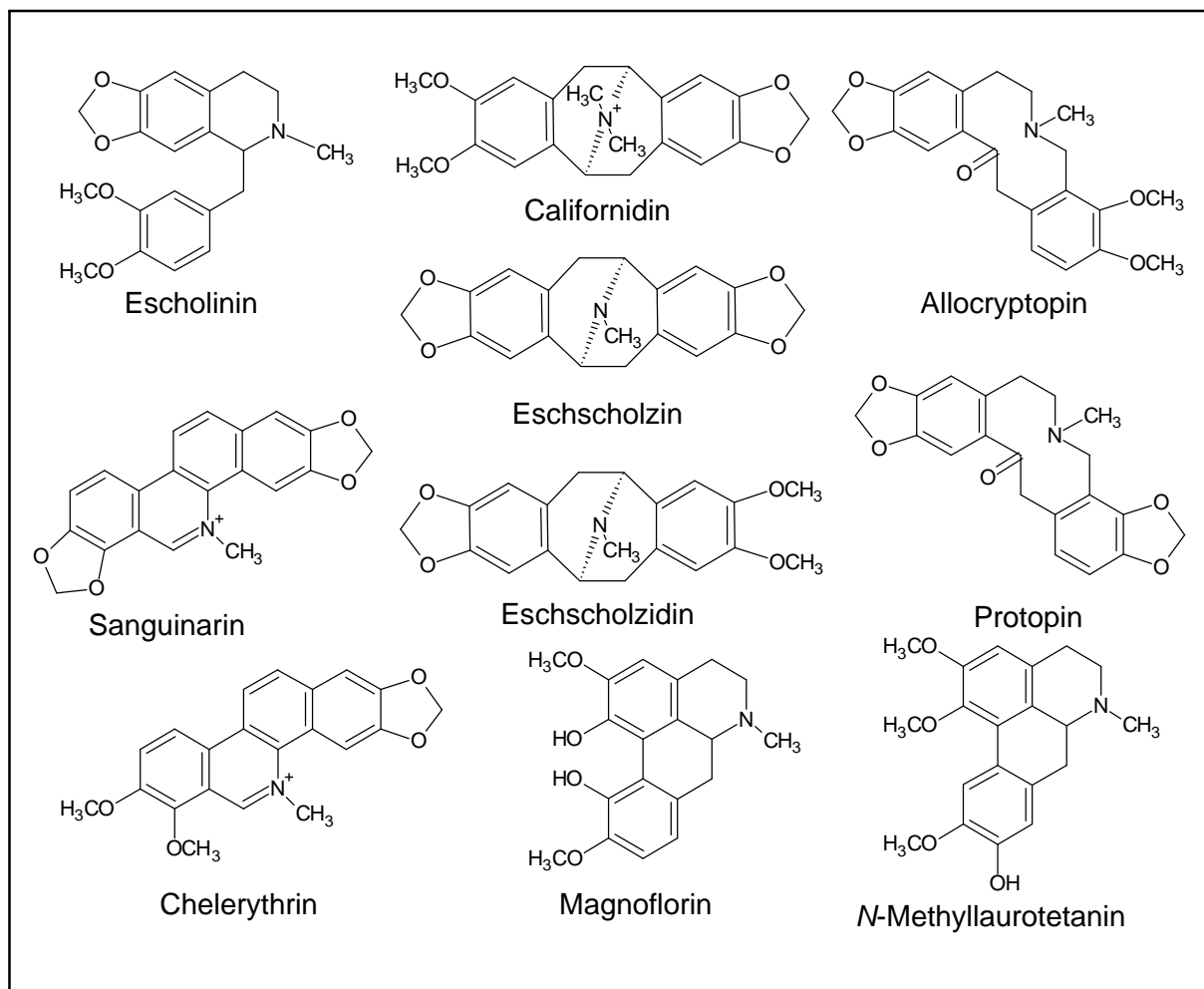


Abb. 1.6: Strukturen einiger bekannter Benzylisochinolinalkaloide aus *E. californica*. Es kommen Benzylisochinolinalkaloide vom Pavin-Typ (Californidin, Eschscholzin (= Californin), Eschscholzidin), vom Protopin-Typ (Protopin und Allocryptopin), vom Aporphin-Typ (*N*-Methylaurotetanin (= Lauroscholzin) und Magnoflorin (= Escholin)), vom Benzo[*c*]phenanthridin-Typ (Chelerythrin und Sanguinarin) und Benzylisochinolin-Typ (z. B. Escholinin) in *E. californica* vor.

Die Originalrezeptur des Mundwassers Viadent[®] (Colgate-Palmolive) enthielt ursprünglich das Benzo[*c*]phenanthridinalkaloid Sanguinarin. Inzwischen wurde die Rezeptur jedoch geändert, weil Sanguinarin im Verdacht steht die Bildung von präkanzeröser Leukoplakie der Mundschleimhaut zu begünstigen (Mascarenhas *et al.*, 2002). Suspensionszellkulturen von *E. californica* produzieren ebenfalls Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide (Schumacher *et al.*, 1987; Tanahashi & Zenk, 1990 a; Klvana *et al.*, 2006). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von *E. californica* als Modellsystem ist die Transformierbarkeit dieser Spezies (MacLeod & Facchini, 2006). Die erfolgreiche Anwendung der Methode des *Virus-induced Gene Silencing* (VIGS) wurde für *P. somniferum* wie auch für *E. californica* beschrieben (Hileman *et al.*, 2005; Wege *et al.*, 2007).

1.6 Die Regulation der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidbiosynthese

Eine eher zufällige Entdeckung führte zu der Erkenntnis, dass die Biosynthese der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide in *E. californica* induzierbar ist: An der Kontaktstelle zwischen einer Kalluskultur und einer pilzlichen Kontamination verfärbte sich das Medium infolge der Bildung und Sekretion der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide rötlich (Schumacher *et al.*, 1987). Die Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidbiosynthese lässt sich auch in Zellkulturen von *P. somniferum* und *S. canadensis* durch Elicitierung induzieren (Eilert *et al.*, 1985; Eilert & Constabel, 1986; Zulak *et al.*, 2007; Arakawa *et al.*, 1992). Die Berberin-Biosynthese in *Thalictrum rugosum* ist ebenfalls durch Elicitierung induzierbar (Funk *et al.*, 1987; Gügler *et al.*, 1988). Damit müssen die Benzo[*c*]phenanthridin- und Protoberberin-Alkaloide zu den Phytoalexinen (von griech.: phytos = Pflanze und alekein = "abwehren") gezählt werden, mit denen niedermolekulare Verbindungen bezeichnet werden, die im Allgemeinen antimikrobielle Eigenschaften aufweisen und deren Synthese unmittelbar durch den Pathogen ausgelöst wird. Gezieltere Untersuchungen ergaben, dass die Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidbiosynthese in *E. californica* durch Zellwandpräparationen aus *Penicillium* und der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), aber nicht durch Elicitorpräparationen aus *Phytophthora megasperma* oder *Alternaria* induziert wird und dass durch die Elicitierung vermehrt die quaternären Benzo[*c*]phenanthridine gebildet werden (Schumacher *et al.*, 1987). Nach dem Kontakt mit dem mikrobiellen Elicitor kommt es zu einem transienten Anstieg der endogenen Jasmonsäure (JA) in den Zellen (Gundlach *et al.*, 1992; Mueller *et al.*, 1993). JA wirkt bei der Elicitierung als Signalvermittler (*second messenger*) und steuert eine weitere Kaskade von Reaktionen, die zur *de novo* Transkription der biosynthetischen Gene und

schließlich zur Produktion der Phytoalexine führt. Die Biosynthese der Jasmonsäure und verwandter Octadecanoide erfolgt über den Oxylipidstoffwechsel ausgehend von α -Linolensäure (Wasternack, 2007). Neben JA wirken auch Methyljasmonat (MeJA) und die Vorstufe 12-Oxophytodiensäure (OPDA) als potente Induktoren der Benzo[*c*]phenanthridin-alkaloidbiosynthese in *E. californica* (Kutchan, 1993; Blechert *et al.*, 1995; Parchmann *et al.*, 1997). Das *Pseudomonas syringae* Toxin Coronatin, ein Strukturanalogen der JA, ist ebenfalls als Elicitor wirksam, induziert jedoch nicht die endogene JA-Biosynthese in den getesteten Zellkultursystemen (Weiler *et al.*, 1994; Haider *et al.*, 2000). Einige Barbiturate wurden ebenfalls als Elicitor der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* beschrieben (Haider *et al.*, 1997). MeJA gilt jedoch als universeller Induktor des Sekundärstoffwechsels in Pflanzen und demonstriert die wichtige Rolle der Octadecanoide in der Stress-induzierten Signaltransduktion. Einige Beispiele sollen stellvertretend für die vielen unterschiedlichen induzierten Stoffwechselwege genannt werden: So steigert die Applikation von MeJA die Alkaloidproduktion in Keimlingen von *Catharanthus roseus* (Catharanthin, Tabersonin und Vindolin) und *Cinchona ledgeriana* (Cinchonin) (Aerts *et al.*, 1994). In Suspensionszellkulturen von *C. roseus* induziert MeJA ebenfalls die TIA-Synthese (Menke *et al.*, 1999 a). Auch die Biosynthese von Paclitaxel und Baccatin III in *Taxus*-Zellkulturen lässt sich durch MeJA induzieren (Yukimune *et al.*, 1996; Ketchum *et al.*, 1999 und 2003; Jennewein *et al.*, 2004). Die Synthese von Camalexin und weiteren Indolglukosinolaten in *A. thaliana* wird ebenso durch MeJA stimuliert (Brader *et al.*, 2001).

Die Elicitorpräparation aus *S. cerevisiae* (Hefeelicitor) wird ebenfalls häufig zur Induktion und Untersuchung von zahlreichen Sekundärstoffwechselwegen verwendet. Sie induziert nicht nur die Synthese der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide in Suspensionskulturzellen von *E. californica*, sondern unter anderem auch die TIA-Produktion in *Rauvolfia canescens* und *C. roseus* (Gundlach *et al.*, 1992; Menke *et al.*, 1999 a).

Typisch für jede Art der Elicitierung ist die sequenzielle Abfolge von Ereignissen, die als Signaltransduktion bezeichnet werden (Zhao *et al.*, 2005). Nach der Erkennung des Elicitors durch die Pflanzenzelle kommt es zu reversiblen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Plasmamembran- und cytosolischen Proteinen und einem Anstieg der cytosolischen Kalziumionenkonzentration. Die Depolarisation der Plasmamembran führt zu einem Ausstrom von Chlorid- und Kaliumionen und einem Einstrom von Protonen, woraus eine extrazelluläre Alkalisierung und eine cytoplasmatische Ansäuerung resultieren. Es kommt zur Aktivierung von MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) Kaskaden, der NADPH-Oxidase und der Produktion von ROS (*reactive oxygen species*). Diese Vorgänge

sorgen für die Expression der frühen Verteidigungsgene und die Produktion von verstärkenden Signalstoffen, wie JA und Ethylen. Letztendlich kommt es zur Expression der späten Verteidigungsgene und zur Akkumulation von Phytoalexinen und Sekundärmetaboliten.

In Zellsuspensionskulturen von *Rauvolfia canescens* und *Eschscholzia californica* beginnt circa 30 Minuten nach Elicitierung die Zunahme an JA und erreicht ungefähr nach 45 bis 60 Minuten ihr Maximum (Gundlach *et al.*, 1992). Die Zunahme der Transkriptmenge des BBE beginnt zwei Stunden nach Elicitierung und erreicht nach sechs Stunden ihr Maximum in Zellkulturen von *Eschscholzia californica*. (Dittrich & Kutchan, 1991). Die Steigerung der BBE-Enzymaktivität kann nach vier bis sechs Stunden beobachtet werden. Sie erreicht nach 16 Stunden ihre maximale Aktivität (7-fache Steigerung gegenüber der Kontrolle) und bleibt 48 Stunden lang erhöht. Die Alkaloidgehalte steigen acht bis zehn Stunden nach der Elicitierung und die Akkumulation dauert mehrere Tage lang an. Mit MeJA als Induktor wurden prinzipiell sehr ähnliche Kinetiken beobachtet, jedoch bewirkt MeJA eine länger andauernde Transkription (Kutchan & Zenk, 1993). Für CYP80B1 wurde ebenfalls eine transkriptionelle Aktivierung durch MeJA mit der maximalen Transkriptakkumulation nach neun Stunden beschrieben, wogegen die Transkripte der CPR und CYP82B1 nur geringer zunahmen (Pauli & Kutchan, 1998). Auf enzymatischer Ebene wird durch die Elicitierung eine Steigerung der Aktivitäten sämtlicher Cytochrom-P450-Enzyme und des BBE erreicht (Blechert *et al.*, 1995). Die Aktivitäten der Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase und der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase werden dagegen nur gering oder überhaupt nicht induziert (Blechert *et al.*, 1995). In Suspensionszellkulturen von *P. somniferum* werden nach Elicitierung mit einer Elicitorpräparation aus *Botrytis cinerea* die Transkripte aller biosynthetischen Enzyme der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidsynthese, inklusive der Methyltransferasen, induziert (Zulak *et al.*, 2007).

Für die Produktion von Benzo[*c*]phenanthridinalkaloiden in elicitierten Suspensionskulturzellen von *E. californica* ist noch ein weiterer JA-unabhängiger Signaltransduktionsweg existent (Färber *et al.*, 2003). Niedrige Elicitorkonzentrationen sorgen für eine transiente Acidifizierung des Cytoplasmas durch Protonen aus der Vakuole, welche ausreicht, um die Phytoalexinsynthese zu stimulieren (Roos *et al.*, 1998). Dabei tritt keine hypersensitive Reaktion auf und die Zellen produzieren keine Polyphenole und phenolische Substanzen („*Browning*“) infolge erhöhter Polyphenol- und Peroxidase-Aktivitäten. Der Elicitorkontakt führt zur Aktivierung der G α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins, welches wiederum die Phospholipase A₂ aktiviert (Viehweger *et al.*, 2006, Heinze *et al.*, 2007). In der

Folge kommt es durch Hydrolyse von Membran-Phospholipiden zu einer Anhäufung von Lysophosphatidylcholin in der Zelle, das die Aktivierung von H^+/Na^+ -Antiportern in der Tonoplastenmembran bewirkt (Viehweger *et al.*, 2002). Wie die transiente Ansäuerung des Cytosols die Expression der Alkaloidbiosynthesegene induziert ist noch nicht geklärt.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Suspensionskulturzellen von *E. californica* stellen ein hervorragendes System zur Untersuchung der Stress-induzierten Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidbiosynthese dar. Die Applikation von MeJA oder einer Elicitorpräparation aus Hefe aktivieren die Transkription der biosynthetischen Gene, woraus eine Steigerung der Enzymaktivitäten und schließlich die Akkumulation der Alkaloide resultieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Regulation der transkriptionellen Induktion der Biosynthesegene untersucht und beteiligte Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

Da bislang noch nichts über die beteiligten transkriptionellen Regulatoren der Benzylisochinolinbiosynthese und über vorhandene *cis*-Elemente in den Promotoren der biosynthetischen Gene bekannt war, erschien ein globaler Ansatz über den Vergleich von Genexpressionsprofilen Erfolg versprechend.

Zunächst sollte eine EST- (*expressed sequence tag*) Datenbank aus elicitierten *E. californica* Suspensionskulturzellen erstellt werden. Durch die gezielte Wahl der Zeitpunkte kurz nach der Elicitierung und zu einem späteren Zeitpunkt wurde das Vorhandensein von cDNAs von Transkriptionsfaktoren und auch von Enzymen der Alkaloidbiosynthese in der cDNA-Bibliothek erwartet.

Für die folgenden Genexpressionsanalysen sollten cDNA-Microarrays erstellt und verwendet werden. Hierfür war geplant die nicht-redundanten cDNAs aus der EST-Datenbank auf Macroarray-Membranen aufzubringen und zur Hybridisierung mit der Proben-cDNA zu verwenden. Es sollten die Expressionsprofile nach Elicitorzugabe und MeJA-Applikation untersucht und mit dem Expressionsprofil der Kontrollkultur verglichen werden.

Ein weiteres Ziel war die Klonierung der Promoterregionen von biosynthetischen Genen mittels PCR-basierten *Genome Walking* und deren *in silico* Analyse auf enthaltene *cis*-regulatorischen Elemente. Das Vorhandensein bestimmter *cis*-Elemente kann Hinweise auf mögliche an ihrer Regulation beteiligte Transkriptionsfaktoren geben.

Durch heterologe Expression der cDNA des Transkriptionsfaktors EcaERF2 in *E. coli* sollte ausreichend Protein gewonnen werden, um DNA-Bindungsversuche (EMSA) durchführen zu

können. Es sollte dabei überprüft werden, ob der in den Genexpressionsanalysen aufgefallene AP2/ERF-Transkriptionsfaktor EcaERF2 *in vitro* an das im Promoter des BBE identifizierte GCC-Box Motiv bindet. Um Aussagen über die Bindungsspezifität von EcaERF2 machen zu können sollte im Folgenden die Bindung an weitere strukturell verwandte *cis*-Elemente wie DRE und JERE untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzliches Material

Die verwendete Zellsuspensionskultur von *E. californica* (Cham.) Stamm AST entstammte aus der Sammlung des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie Halle (Saale). Die Kultivierung erfolgte in 1 Liter-Erlenmeyerkolben mit 400 ml LS-Medium (Linsmaier & Skoog, 1965). Die Zellsuspensionskulturen wurden bei 23 °C und Dauerbeleuchtung mit einer Lichtintensität von 750 lux auf Rotationsschüttlern (100 Upm) angezogen. Die Subkultivierung erfolgte im 7-Tage-Rhythmus. Dazu wurden 150 ml Zellsuspensionskultur auf 250 ml frisches LS-Medium überimpft.

2.1.2 Bakterienstämme

Untenstehend werden die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme mit Angabe ihrer Herkunft, der jeweiligen genetischen Charakteristika und dem Verwendungszweck aufgelistet. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf Agarplatten (1,5 % Bacto-Agar) oder als Suspensionskulturen (180 Upm) in Luria-Bertani (LB) Medium (Sambrook & Russell, 2001) bei 37 °C. Zur Selektion auf, zumeist durch Plasmide vermittelte, Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte (Nitrocellulose Filter, 45 µm, Sartorius) Antibiotikallösungen folgender Endkonzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100 mg/L
Chloramphenicol	34 mg/L
Kanamycin	50 mg/L
Streptomycin	25 mg/L
Tetracyclin	12,5 mg/L

Chloramphenicol und Tetracyclin wurden als ethanolische Stammlösungen angelegt. Die Antibiotika wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen.

E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^r\text{)]}$

Verwendung: Wirtsstamm für den pZL1 Vektor.

***E. coli* SOLR** (Stratagene)

Genotyp: e14(McrA⁻) $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$ *sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5*
(Kan^r) *lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1* λ^R [F⁺ *proAB lacI^qZAM15*] Su⁻

Verwendung: Wirtsstamm für den pBluescript II SK^{+/-} Vektor.

***E. coli* TOP10F'** (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F⁺[*lacI^q Tn10 (Tet^R)*] *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$
 $\Delta lacX74$ *recA1 araD139* $\Delta(ara-leu)7697$ *galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG*

Verwendung: Wirtsstamm für den pCR2.1 Vektor.

***E. coli* Nova Blue** (Novagen (Merck), Darmstadt)

Genotyp: *endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*
F⁺[*proA+B+ lacI^q ZAM15::Tn10(Tet^R)*]

Verwendung: Wirtsstamm für den pET41 Vektor.

***E. coli* Rosetta2 (DE3)** (Novagen)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R)*

Verwendung: Expressionsstamm für den pET41 Vektor.

Als Bakterienstamm für Arbeiten mit rekombinanter DNA wurde standardmäßig *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) verwendet. Die cDNA-Klone des Floral Genome Projekts (FGP, Penn State University, USA) wurden als Stichkulturen in *E. coli* SOLR (Stratagene) erhalten.

2.1.3 Plasmide

pBluescript II SK^{+/-} (Stratagene) ist ein 3,0 kb großer Phagemidvektor, der durch *in vivo* Excision aus λ ZAP DNA erhalten wird. Durch die im *lacZ*-Gen integrierte multiple Klonierungsstelle wird eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht. Die SK-Version bezeichnet die Orientierung der multiplen Klonierungsstelle, bei der die *SacI* Restriktionsschnittstelle am nächsten und die *KpnI* Restriktionsschnittstelle am weitesten vom *lac* Promoter entfernt liegen. Mit + und - wird die Orientierung des f1-Replikationsursprungs zur Generierung von einzelsträngiger DNA beschrieben. Die multiple Klonierungsstelle wird von T7 und T3 RNA-Polymerase-Promotoren flankiert. Weiterhin besitzt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen zu Selektionszwecken.

pCR2.1 (Invitrogen) ist ein 3,9 kb großer, linearisierter Klonierungsvektor und Bestandteil des TA Cloning Kits. Der Vektor besitzt 3'-terminale Thymidinüberhänge zur ungerichteten

Subklonierung mit *Taq* DNA-Polymerase amplifizierter PCR-Produkte mittels T4 DNA-Ligase. Die multiple Klonierungsstelle liegt in einem *lacZ*-Gen und besitzt an beiden Seiten eine *EcoRI* Schnittstelle. Dadurch werden eine Blau-Weiß-Selektion und eine einfache Größenbestimmung des klonierten Fragmentes durch Restriktion mit *EcoRI* ermöglicht. Zur Sequenzierung können die M13 *forward* und M13 *reverse* Primerbindungsstellen benutzt werden. Der Vektor besitzt als Selektionsmarker Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgene.

pET-41 Ek/LIC (Novagen) ist ein 5,9 kb großer bakterieller Expressionsvektor. Das zu exprimierende Polypeptid besitzt eine N-terminale Fusion mit einem GST-Tag, einem 6×His-Tag und einem S-Tag gefolgt von einer Enterokinase-Erkennungssequenz. Dadurch wird eine Affinitätsreinigung mit anschließender Abspaltung aller vektorcodierten Sequenzen möglich. Die LIC (*ligation-independend cloning*)-Methode nutzt die 3'→5'-Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase, um spezifische, einzelsträngige Überhänge für eine direktionelle Klonierung zu generieren. Dazu wird ein PCR-Produkt mit Primern erzeugt, die zum Vektor komplementäre 5'-Überhänge enthalten. Dieses wird mit T4 DNA-Polymerase in Anwesenheit von ATP inkubiert und anschließend mit dem Vektor ligiert. Das Plasmid besitzt ein Kanamycin-Resistenzgen zu Selektionszwecken.

pZL1 (Invitrogen) ist ein 4,3 kb großer Phagemidvektor, der durch *in vivo* Excision aus λ ZipLox DNA erhalten wird. Der Vektor ist ein Derivat von pSport1 und besitzt ein *lacZ*-Gen mit integrierter multipler Klonierungsstelle, wie sie in pUC-Vektoren vorkommt, sowie ein Ampicillin-Resistenzgen. Die multiple Klonierungsstelle wird von T7 und SP6 RNA-Polymerase-Promotoren flankiert.

Die cDNA-Klone der in dieser Arbeit erstellten cDNA-Bibliothek wurden in das Plasmid pZL1 (Invitrogen) kloniert. Die cDNA-Klone des FGP dagegen lagen in pBluescript II SK^{+/−} (Stratagene) vor.

2.1.4 Oligonukleotide

Oligonukleotidprimer für die PCR und die Sequenzierung wurden von den Firmen MWG Biotech AG (Ebersberg) und Biomers.net GmbH (Ulm) bezogen.

Als Standardsequenzierungsprimer für das Plasmid pZL1 wurden für das 5'-Ende der Primer pZL1-T7 und für das 3'-Ende der Primer pZL1-sp6 verwendet. Für das Plasmid

pBluescript II SK^{+/−} wurden für das 5'-Ende der Primer pBKIIISK-SK und für das 3'-Ende der Primer pBKIIISK-T7 verwendet. Für die Reamplifikation der cDNA-Inserts wurden für das Plasmid pZL1 die Primer pZL1-F1 und pZL1-R1 und für das Plasmid pBluescript II SK^{+/−} die Primer pBKIIISK-SK und pBKIIISK-T7 verwendet. Die Sequenzen dieser und weiterer Oligonukleotide sind im Anhang (siehe Tab. 7.1) entsprechend ihrer Verwendung aufgeführt.

2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien wurden in der gewünschten Reinheit, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Merck (Darmstadt), und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Die Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten wurden, falls nicht besonders angegeben, von den Firmen Invitrogen, Promega (Mannheim), New England BioLabs (Frankfurt) und Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert. Verschiedene Kits zur Nukleinsäure-Isolation wurden von Qiagen (Hilden) verwendet. Desoxynukleotide (dNTPs) wurden bei Qbiogene (Heidelberg) bestellt. Heringsperma-DNA wurde von Serva bezogen. Kulturmittelbestandteile wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg) (Trypton und Hefeextrakt) und Serva (Bacto-Agar) verwendet. Die Radiochemikalien [α -³²P]-dATP (3000 Ci/mmol) und [α -³³P]-dATP (3000 Ci/mmol) wurden von MP Biomedicals (Heidelberg) geliefert. Die Präparation des Hefeelicitors erfolgte wie in der Dissertation von H. Gundlach beschrieben durch Präzipitation mit Ethanol und Gefriertrocknung (Gundlach, 1992). Aus 1 kg Bäckerhefe (F.X. Wiener Hefefabrik, Passau) konnten 20 g 1. Niederschlag und 8 g 2. Niederschlag gewonnen werden. Für die Bereitstellung des Methyljasmonats danke ich Dr. R. Kramell (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie). Zum Ansetzen aller Lösungen wurde entionisiertes Wasser einer Milli-Q Anlage (Millipore, Schwalbach) verwendet.

2.1.6 Geräte

Sofern im Methodenteil nicht speziell angegeben, kamen folgende Geräte zum Einsatz:

Photometer:	Photometer DU 640 (Beckman Coulter, Krefeld) Ultrospec 3000 (GE Healthcare)
Steriltechnik:	Sterilwerkbank HERAsafe (Heraeus, Hanau) Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
Waagen:	Feinwaage Model OC 210-A (Omnilab, Bremen) Waage Model MC 1 (Sartorius, Göttingen)
Zentrifugen:	Kühlzentrifuge 5810R (Eppendorf, Hamburg) Picofuge (Stratagene) Tischzentrifuge 5415R (Eppendorf) Zentrifuge Sorvall RC 26 Plus (Du Pont)
Sonstige Geräte:	Hybridisierungssofen Model 7601 (GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) Kühlwasserbad Model K15 (Haake, Karlsruhe) Magnetrührer Model RCT basic (IKA Werke, Staufen) Mikrowelle M732 (Miele, Gütersloh) pH-Meter inoLab pH Level 1 (WTW, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim) Speedvac SPD111V Thermo Savant (Thermo Fisher Scientific) Thermomixer 5436 (Eppendorf) Ultraschall Sonorex RK-100 (Bandelin, Berlin) UV Stratalinker 1800 (Stratagene) Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) Wasserbad Model 13 A (Julabo Labortechnik, Seelbach)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Das Pflanzenmaterial wurde wie unter 2.2.1.2 beschrieben geerntet, in einem mit flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser zu einem feinem Pulver zerrieben und in gefrorenem Zustand in 10 Volumen (ml/g) Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol) überführt. Nach Zugabe von 0,6 Volumen (ml/g) 20 % SDS wurde gründlich gemischt und die Suspension für 10 min bei 65 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 3 Volumen (ml/g) 5 M Kaliumacetat und eine Inkubation für 20 min auf Eis. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4.000 Upm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, mit 8 Volumen (ml/g) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4.000 Upm und 4 °C wurde die wässrige Oberphase abgenommen und die DNA mit 0,5 Volumen (v/v) Isopropanol ausgefällt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4.000 Upm und 4 °C wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, nur leicht getrocknet und die DNA in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst.

2.2.1.2 Isolierung von pflanzlicher Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Suspensionskulturzellen erfolgte nach einem modifizierten TRIzol-Protokoll (Chomczynski & Sacchi, 1987). Die Zellen wurden durch Vakuumfiltration vom Kulturmedium getrennt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Im mit flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser wurden die Proben zu einem feinem Pulver zerrieben und in gefrorenem Zustand in 10 Volumen (ml/g) Extraktionspuffer (0,8 M Guanidinthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Natriumacetat pH 5,0, 5 % (v/v) Glycerin, 38 % (v/v) Phenol) überführt. Nach 1 min kräftigen vortexen, 5-minütiger Inkubation bei RT und erneutem vortexen, wurde Chloroform (20 % (v/v) des Extraktionspuffervolumens) zugegeben und gut gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde zur Phasentrennung bei 4.000 Upm und RT für 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, ein Volumen (v/v) Isopropanol zugegeben, durch Invertieren gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Dann folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4.000 Upm und 4 °C. Das Pellet wurde in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich in sterilem Wasser resuspendiert.

2.2.1.3 Isolierung von Poly(A)⁺-RNA

Ausgehend von der Gesamt-RNA (s. 2.2.1.2) wurde die Poly(A)⁺-RNA unter Verwendung des Oligotex mRNA Midi Kits (Qiagen) nach den Herstellervorgaben isoliert.

2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) gemäß der Herstellervorschrift.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA im 96er-Format

Dem folgenden Protokoll liegt das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) zugrunde. Es wurde für den großen Probandendurchsatz in Mikrotiterplatten mittels Zentrifugation optimiert. Einzelkolonien von *E. coli* wurden zufällig ausgewählt und in 1 ml 2×LB (20 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro 1 Liter) mit Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml) in 96er Deep-Well-Blocks (Flat-Bottom Blocks, Qiagen) angeimpft. Die Blöcke wurden mit luftdurchlässiger Klebefolie (AirPore Tape Sheets, Qiagen) bedeckt und bei 300 Upm und 37 °C für 20-24 Stunden inkubiert. Vor der Plasmid-DNA-Isolation wurden von den cDNA-Klonen Glycerinkulturen in 96er Mikrotiterplatten angelegt. Zur Plasmid-Isolation wurden die Blöcke bei 1.500 ×g (2.952 Upm) für 5 min zentrifugiert und das Kulturmedium abgekippt. Die Bakterienpellets wurden in 80 µl Lösung 1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A (Serva)) vollständig resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 80 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS). Nach 5-minütiger Inkubation wurde 80 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) zur Neutralisation zugegeben und nochmals für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Blöcke bei 4.000 Upm (2.755 ×g) für 15 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 150 µl Lösung 4 (6,1 M KJ) in jedes Loch der Multiscreen FB Platte (Millipore, MAFBNOB10) gegeben. Das klare Lysat wurde aus den Blöcken abgenommen und zu den 150 µl Lösung 4 in die Multiscreen FB Platte gegeben und durch Pipettieren gemischt. Die Multiscreen-Platten wurden dann mit einer Mikrotiterplatte als Auffanggefäß bei 1.000 ×g (2.410 Upm) für 5 min zentrifugiert. Dabei bindet die Plasmid-DNA an die Membran der Multiscreen-Platten. Die Multiscreen-Platten wurden dann zweimal mit 200 µl 80 % (v/v) Ethanol gewaschen und mit einer Mikrotiterplatte als Auffanggefäß zentrifugiert. Nach einer letzten Zentrifugation zum Trocknen der Platten wurde in jede Öffnung der Multiscreen-Platte 60 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) pipettiert und diese für 5 min inkubiert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch Zentrifugation in eine neue Mikrotiterplatte. Diese wurde mit

Klebefolie (Thermowell Sealers, Corning) und Deckel verschlossen und bei 4 °C gelagert. Für eine längere Lagerung empfiehlt es sich die Mikrotiterplatten in der Speedvac zu trocknen. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug bei dem verwendeten *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF' und dem Plasmid pZL1 sehr konstant circa 150 µg/ml.

2.2.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch getrennte DNA wurde mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gemäß der Herstellervorschrift isoliert.

2.2.1.7 Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und Gesamt-RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht nach dem Lambert-Beerschen Gesetz eine Extinktion von $E = 1,0$ einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurde die Verunreinigung durch Proteine bestimmt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm sollte dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration von kurzen DNA-Fragmenten (z. B. PCR-Produkte) wurde nach der Gelelektrophorese durch den Vergleich mit dem Lambda DNA *EcoRI/HindIII*-Marker (Fermentas) abgeschätzt.

2.2.2 Gelelektrophorese

Für die Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese standen horizontale und vertikale Elektrophoreseapparaturen (Biometra, Göttingen) in verschiedenen Größen zu Verfügung. Als Spannungsquelle diente das Modell E455 (Consort, Turnhout, Belgien). Die Geldokumentation erfolgte mit dem GeneGenius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK).

2.2.2.1 Trennung von DNA über Agarosegele

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau erfolgte in 1%igen Agarosegelen (in 1×TAE-Puffer) für 1-2 h bei einer Spannung von 5 V/cm in 1×TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0). Für die spätere Visualisierung der der DNA wurde dem Gel 1 µg/ml Gellösung Ethidiumbromid (10 mg/ml, Roth) zugegeben. Als Längenstandards wurden die SmartLadder (Eurogentec, Liège, Belgien), die 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) und der Lambda DNA *EcoRI/HindIII*-Marker (Fermentas) verwendet.

2.2.2.2 Trennung von RNA über Agarosegele

RNA wurde in einem 1,2%igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel (2 % (v/v) Formaldehyd in 1×MOPS-Puffer (40 mM MOPS, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0)) für ca. 3 h bei einer Spannung von 5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurden die RNA-Proben für 20 min bei 65 °C in 3 Volumenteilen Denaturierungspuffer (1×MOPS, 8,5 % (v/v) Formaldehyd, 64 % (v/v) Formamid) denaturiert und mit 1/10 Volumen 10×Ladepuffer (50 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 mg/ml Ethidiumbromid) versetzt.

2.2.2.3 Trennung von Proteinen über Polyacrylamidgele

Zur Kontrolle der Proteinreinigung wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Laemmli, 1970). Für die Herstellung der Gele diente die konzentrierte Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth), die 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid enthält. Ammoniumpersulfat (APS) und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurden ebenfalls von Roth bezogen. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Konzentrierung erfolgte in einem 4%igen Sammelgel bei 24 mA und die Auftrennung in einem 12%igen Trenngel bei 48 mA. Als Größenstandard wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) verwendet. Die Anfärbung der Proteine erfolgte durch 30-minütiges Schwenken in Coomassie-Färbelösung und anschließendes Entfärben des Hintergrundes. Folgende Lösungen wurden benötigt:

Trenngel:

375 mM Tris/HCl, pH 8,8
12 % (v/v) Acrylamid
5 % (v/v) Glycerin
0,1 % (w/v) SDS
0,05 % (w/v) APS
10⁻³ % (v/v) TEMED

Sammelgel:

125 mM Tris/HCl, pH 6,8
4 % (v/v) Acrylamid
0,1 % (w/v) SDS
0,08 % (w/v) APS
2×10⁻³ % (v/v) TEMED

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris
200 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

Probenpuffer:

125 mM Tris/HCl, pH 6,8
20 % (v/v) Glycerin
4 % (w/v) SDS
4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
0,5 % (w/v) Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung:

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
10 % (v/v) Essigsäure
50 % (v/v) Methanol
1 % (v/v) Glycerin

Entfärbelösung:

7 % (v/v) Essigsäure

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode nach Bradford (1976) unter Verwendung des Farbstoffkonzentrats von Bio-Rad (München). Die Konzentration der jeweiligen Probe wurde aus der gemessenen Absorption bei 595 nm und einer mit BSA (Fraktion V, Roth) als Standardprotein erstellten Eichgeraden ermittelt.

2.2.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.3.1 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Für den Restriktionsverdau wurden ca. 1 Unit Restriktionsenzym pro µg DNA verwendet. Die Reaktion erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller (Invitrogen) mitgelieferten Inkubationspuffer beim jeweiligen Temperaturoptimum für mindestens eine Stunde.

2.2.3.2 Ligation von DNA

Die Ligation erfolgte durch 2 Units T4 DNA-Ligase (Promega) bei 16 °C über Nacht. Ein Ligationsansatz enthielt 50-100 ng des Vektorfragmentes und die dreifache molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragmentes. Ein Zehntel des Ligationsansatzes wurde direkt für die Transformation der kompetenten *E. coli* Zellen verwendet.

2.2.3.3 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung der cDNA-Sonden mit [α -³²P]-dATP und [α -³³P]-dATP wurde unter Verwendung des Megaprime DNA Labelling Kits (GE Healthcare, München) durchgeführt. Die Entfernung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte mittels Gelfiltration

(Probe Quant G50 Micro Columns, GE Healthcare). Die Einbaurate wurde durch Messung der Radioaktivität von 1 µl vor und nach der Gelfiltration mit dem Szintillationszähler LS 6500 (Beckman Coulter) bestimmt.

2.2.4 Blotting und Hybridisierung von Nukleinsäuren

Für die Herstellung von Northern Blots wurden 10 µg Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer auf die Nylonmembran (Biodyne B, 0,45 µm, Pall GmbH, Dreieich) erfolgte durch die Kapillar-Blot-Methode (Sambrook & Russel, 2001) mit anschließender Fixierung durch UV-Crosslinking (120 mJ cm⁻², Stratalinker 1800, Stratagene).

Die radioaktive Markierung der cDNA-Sonden mit [α -³²P]-dATP wurde unter Verwendung des Megaprime DNA Labelling Kits (GE Healthcare) durchgeführt.

Nach Anfeuchtung der Membran in 2×SSC und ca. dreistündiger Prähybridisierung in 5 ml ExpressHyb Hybridisierungslösung (BD Biosciences, Heidelberg) erfolgte die Zugabe der zuvor für 5 min bei 95 °C denaturierten Sonde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungsöfen (Modell 7601, GFL). Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 min bei 65 °C mit 2×SSC, 0,1 % (w/v) SDS gewaschen und gegen einen Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics) exponiert. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte durch Scannen des Phosphorimagescreens mit dem Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics) bei einer Auflösung von 200 µm.

2.2.5 Amplifizierung von DNA durch die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur exponentiellen Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten *in vitro* unter Verwendung von Oligonukleotidprimern und thermostabilen DNA-Polymerasen (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). Die PCR besteht aus drei sich zyklisch wiederholenden Einzelschritten: Hitzedenaturierung bei 94-96 °C, Anlagerung der Primer bei 40-60 °C und DNA-Synthese bei 72 °C. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte im Thermocycler GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) oder im PTC-200 DNA Engine (MJ Research, South San Francisco, CA, USA) für 30 bis 35 Zyklen (30 s 96 °C, 30 s 60 °C, 1-3 min 72 °C). Der Reaktion ging eine Denaturierung der Matrizen-DNA von 2 min bei 96 °C voraus und sie wurde durch eine finale DNA-Polymerisation von 7 min beendet. Als DNA-Polymerasen wurden verschiedene Enzyme verwendet. Standardmäßig wurde eine *Taq* DNA-Polymerase (rekombinant aus *E. coli*, Dr. J. Ziegler) mit 10×Puffer (0,1 M Tris/HCl, 0,5 M KCl, 1 % Triton X-100) gebraucht. Für die Amplifizierung von besonders langen DNA-Bereichen wurde die *Ex-Taq* DNA-Polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan) mit zugehörigem Puffer (und

MgCl₂) verwendet. Wenn eine möglichst fehlerfreie Amplifizierung wichtig war, wurde eine *Pfu* DNA-Polymerase (Fermentas) mit vom Hersteller gelieferten Puffer (und MgSO₄) eingesetzt.

2.2.6 Schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden (RACE)

Für die schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden mittels PCR (RACE-PCR) wurde das SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences) verwendet. Die SMART (*Switching Mechanism At 5' end of the RNA Transcript*) Technologie (Chenchik *et al.*, 1998) kommt ohne die Ligation von Adaptoren aus und verwendet ein spezielles SMART II A Oligonukleotid sowie die *Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase* (MMLV-RTase). Durch die terminale Transferase-Aktivität der MMLV RTase werden während der Erststrangsynthese drei bis fünf zusätzliche Nukleotide (gewöhnlich Cytosin-Reste) an das 3'-Ende des cDNA-Erststranges gehängt. Das SMART II A Oligonukleotid enthält am Ende einen Abschnitt mit Guanin-Resten und kann an das Cytosin-reiche cDNA-Ende binden und als verlängerte Vorlage für die Zweitstrangsynthese dienen. Da die terminale Transferase-Aktivität der MMLV-RTase nach Erreichen des Endes der RNA-Vorlage am größten ist, wird durch die SMART-Technologie die Generierung von vollständigen cDNAs bevorzugt.

2.2.7 Klonierung von genomischer DNA

Für die Klonierung von unbekanntem Promoterbereichen wurde der GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences) verwendet. Das Prinzip beruht auf der Amplifizierung von genomischer DNA mittels PCR, die zuerst mit einem Restriktionsenzym geschnitten und anschließend mit einem Adapter ligiert wurde, unter Verwendung eines sequenzspezifischen Primers und eines Adapterprimers (Siebert *et al.*, 1995). Die Restriktionsenzyme (die Länge der Erkennungssequenz ist variabel) müssen glatte Enden (*blunt ends*) liefern. Es wurden *Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II und *Stu*I verwendet. Für die PCR wurde der Advantage Genomic Polymerase Mix (BD Biosciences) verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert und in *E. coli* TOP10F'-Zellen transformiert. Nach Isolation der Plasmid-DNA wurden die Inserts unter Verwendung von Vektorprimern und sequenzspezifischen Primern sequenziert.

2.2.8 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Die Herstellung der kompetenten *E. coli*-Stämme TOP10F' und XL1-Blue MRF' wurde nach dem Protokoll von Inoue *et al.* (1990) durchgeführt. Die kompetenten Zellen wurden bis zur

Transformation in Aliquots zu 200 µl (in TFB, 7 % DMSO) bei -80 °C gelagert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock (42 °C).

2.2.9 Erstellung der cDNA-Bibliothek

Für die Konstruktion der cDNA-Bibliothek wurde das SuperScript Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning Kit (Invitrogen, ehemals von GIBCO BRL/Life Technologies) nach den Herstellervorgaben verwendet. Da die zum Kit gehörenden λ ZipLox *NotI/SalI*-Arme nicht mehr lieferbar waren, wurden die cDNA-Fragmente direkt in das mit *NotI* und *SalI* aufgeschnittene Plasmid pZL1 kloniert.

Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese wurde Poly(A)⁺-RNA aus mit dem Hefeelicitor elicierten Zellkulturen verwendet. Es wurden zu gleichen Teilen Poly(A)⁺-RNA aus Proben 0,5, 1, 6 und 12 Stunden nach Elicitierung eingesetzt.

2.2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem 3100*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems) unter Verwendung des ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems). Das Prinzip beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Der BigDye Terminator enthält dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und die DNA-Polymerase. Im Sequenzierer erfolgt die kapillarelektrophoretische Trennung und Detektion mittels CCD-Kamera. Es wurden Capillary Arrays mit 36 und 50 cm Länge und POP-6 Polymer (Applied Biosystems) verwendet. Die Reinigung und Befüllung der Wasserbehälter erfolgte mit LiChrosolv-Wasser (Merck).

Für die Sequenzierungsreaktion konnte die vom Hersteller empfohlene Menge an BigDye Terminator ohne Qualitätseinschränkungen erheblich reduziert werden. Eine Standardsequenzierungsreaktion (10 µl) enthielt 3 µl Plasmid-DNA (~ 450 ng), 1 µl Oligonukleotidprimer (5 pmol/µl), 1,75 µl 5×Puffer, 0,5 µl BigDye v1.1 und 3,75 µl Wasser. Die Amplifikation erfolgte in 25 bis 35 Zyklen zu 10 sec bei 96 °C, 5 sec bei 50 °C und 4 min bei 60 °C. Anschließend wurden dem Ansatz 10 µl Wasser zugegeben. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G50 Fine (GE Healthcare) in Multiscreen HV Platten (Millipore). Das Sephadex-Material wurde mit Hilfe des Multiscreen Column Loaders (Millipore) in die Bohrungen der HV Platte gefüllt, 300 µl Wasser zugegeben und das Material für mindestens drei Stunden gequollen. Nach Zentrifugation bei 910×g für 5 min wurde die Sequenzierungsreaktion auf die Säule gegeben und in eine 96er Sequenzierplatte (G. Kisker GbR, Steinfurt) eluiert.

Schwierig zu sequenzierbare Bereiche, z.B. besonders GC-reiche Regionen, konnten durch Zugabe von 0,5 µl DMSO (5 % (v/v) Endkonzentration) und eine Vorinkubation für 5 min bei 96 °C vor Zugabe des BigDye-Mixes oft dennoch sequenziert werden.

2.2.11 cDNA-Macroarrays

2.2.11.1 Reamplifizierung der cDNA-Inserts mittels PCR

Für die Herstellung von cDNA-Macroarrays wurden zunächst die cDNA-Inserts der ausgewählten Klone mittels PCR unter Verwendung von Vektorprimern reamplifiziert. Für das Plasmid pZL1 wurden die Primer pZL1-F1 und pZL1-R1 verwendet. Für die Klone des FGP, die in pBluescript II SK vorlagen, kamen die Primer pBKIIISK-T7 und pBKIIISK-SK zum Einsatz. Die cDNA des BBE1 lag in pUC18 (Klon pBB II; H. Dittrich) vor. Die cDNA von CYP80B1 wurde durch reverse Transkription mit sequenzspezifischen Primern gewonnen und in den Vektor pCR2.1 kloniert. Als Primer für die Reamplifizierung von BBE1 und CYP80B1 wurden M13 reverse und M13 forward (-20) verwendet.

Eine Reamplifizierungsreaktion (100µl) enthielt 1 µl Plasmid-DNA (~ 150 ng), 10 µl 10×PCR-Puffer (500 mM KCL, 100 mM Tris/HCl pH 9,0, 1 % (v/v) Triton X-100), 6 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl dNTPs (10 mM je Nukleotid), 1 µl Primer A (100 pmol/µl), 1 µl Primer B (100 pmol/µl), 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase und 78,5 µl Wasser. Die Amplifizierung erfolgte mit folgendem Programm: initiale Denaturierung bei 94 °C für 2 min, 35 Zyklen Denaturierung bei 94 °C für 15 sec, Annealing bei 58 °C für 30 sec und Elongation bei 72 °C für 2 min und wurde durch eine finale Elongation bei 72 °C für 7 min abgeschlossen.

Zur Kontrolle wurden 2 µl jeder Reaktion auf ein Agarose-Gel (1 %) aufgetragen. Dadurch wird eine Größenabschätzung des PCR-Produktes möglich und es lassen sich Reaktionen, die kein Produkt oder Mehrfachbanden ergaben identifizieren.

2.2.11.2 Aufreinigung der PCR-Fragmente

Die erhaltenen PCR-Produkte mussten vor Ihrer Verwendung von überschüssigen Nukleotiden und Primern gereinigt sowie aufkonzentriert werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels NucleoFast 96 PCR Platten (Macherey-Nagel, Düren) und einer Vakuumabsaugstation (RoboSeq 4204 S, MWG Biotech AG). Die PCR-Reaktionen wurden in die Löcher der Aufreinigungsplatte gegeben und die Flüssigkeit bei -400 mbar für ca. 15 min abgesaugt. Dabei passieren kleine Moleküle die Membran, während die PCR-Produkte zurückgehalten werden. Anschließend wurden 100 ml Wasser in Öffnungen gegeben und erneut Vakuum

angelegt. Nach diesem Waschschrift wurden die Löcher der Aufreinigungplatte mit 50 µl Wasser befüllt und das gesamte Volumen in 384er Mikrotiterplatten (Nunc, Langensfeld) überführt. Diese wurden in der Speedvac bis zur Trockne einrotiert. Vor Verwendung zum Drucken der Macroarrays wurden die PCR-Produkte in 20 µl Wasser resuspendiert.

2.2.11.3 Drucken der Arrays auf Membranen

Das Drucken der cDNA-Macroarrays erfolgte mit dem *BioRobotics MicroGrid II* (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA) unter Verwendung des 384-Nadel Macrowerkzeuges und der Steuerungs-Software TAS Application Suite II. Die Parameter wurden so gewählt, dass sich Anordnung von 4×4 Punkten pro Microgrid mit einem Abstand von 1,125 mm und einer insgesamt bedruckten Fläche von 72 × 108 mm ergaben. So konnten auf vier Tablett, die mit jeweils sechs Membranen bestückt wurden, in einem Durchgang 24 Membranen bedruckt werden.

Die Nylonmembranen (Biodyne B, 0,45 µm, Pall) wurden auf eine Größe von 8,0 × 12,0 cm zugeschnitten und auf den Tablett befestigt. Die 384er Mikrotiterplatten mit den PCR-Produkten wurden in das Gerät gestellt und das 384er Print-Tool eingespannt. Anschließend wurde der Druckvorgang gestartet. Es wurden jeweils vier Replikate jeder cDNA auf die Membran gespottet. Das sich ergebene Muster ist **Abbildung 2.1** dargestellt. Nach dem Druckvorgang wurden die Nylonmembranen jeweils zweimal nacheinander für 10 min mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) und 2× SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat) behandelt. Schließlich wurden die cDNA-Fragmente auf den Membranen mit UV-Licht (120 mJ cm⁻², Stratallinker 1800, Stratagene) fixiert und die Membranen bis zur Hybridisierung trocken gelagert.

1	2	3	1
2	3	2	4
3	2	3	4
1	4	4	1

Abb. 2.1: Spottmuster

2.2.11.4 Reverse Transkription und radioaktive Markierung

Vor der Hybridisierung mit der Membran und den aufgebracht cDNA-Fragmenten mussten die zu untersuchenden RNA-Proben mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben

und radioaktiv markiert werden. Für die reverse Transkription wurde eine Moloney Maus Leukämie Virus (M-MLV) Reverse Transkriptase mit Punktmutation in der RNase Domäne (Promega) mit dazugehörendem Puffer und ein Oligo-Thymidin-Primer verwendet. Ein Ansatz bestand aus 40 µg Gesamt-RNA, 2 µl Oligo dT20VN-Primer (100 pmol/µl), 8 µl M-MLV RTase 5× Puffer, 1 µl dNTPs (10 mM je Nukleotid) und 1 µl M-MLV RTase (200 U/µl) in 30 µl Gesamtvolumen. Nach Inkubation bei 42 °C für 60 min wurde die Reaktion durch Zusatz von 5 µl 0,5 M EDTA und 1 µl 1N NaOH gestoppt. Es folgte eine weitere Inkubation bei 65 °C für 10 min und nach Zugabe von 10 µl 1 M Tris/HCl, pH 7,5 wurden die nicht eingebauten Nukleotide mittels Gelfiltration (Probe Quant G50 Micro Columns, GE Healthcare) entfernt.

Die radioaktive Markierung der cDNA erfolgte mit [α -³³P]-dATP unter Verwendung des Megaprime DNA Labelling Kits (GE Healthcare). Auch hier erfolgte die Entfernung nicht eingebauter Nukleotide mittels Gelfiltration (Probe Quant G50 Micro Columns). Zusätzlich wurde die Einbaurrate durch Messung der Radioaktivität von 1 µl vor und nach der Gelfiltration mit dem Szintillationszähler LS 6500 (Beckman Coulter) bestimmt.

2.2.11.5 Hybridisierung der Macroarray-Membranen

Zur Hybridisierung wurde die Macroarray-Membran mit 2×SSC angefeuchtet und in 5 ml Hybridisierungslösung (5×SSC, 0,1 % (v/v) SDS, 5×Dehnhardt's, 125 µg/ml Heringsperma-DNA) für 3 h bei 65 °C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Dann erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten cDNA in die warme Hybridisierungslösung und die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C. Anschließend wurden die Macroarray-Membranen dreimal für 15 min bei 65 °C mit 2×SSC, 0,1 % (v/v) SDS gewaschen und für eine Woche gegen einen Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics) exponiert. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte durch Scannen des Phosphorimagescreens mit dem Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics) bei einer Auflösung von 50 µm.

2.2.11.6 Auswertung der cDNA-Macroarrays

Zur Auswertung der cDNA-Macroarrays wurden die Phosphorimage-Daten in die Software AIDA Image Analyzer Version 4.00 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) importiert. Das Programm ermöglicht die Bestimmung der Strahlungsintensität für jeden einzelnen Punkt des Arrays und deren Zuordnung zu den gedruckten cDNA-Fragmenten. Außerdem erfolgte mit AIDA Image Analyzer auch die Subtraktion des Hintergrundes, der als Mittelwert von fünf, über die gesamte Membran verteilten, leeren Positionen definiert war. Die Normalisierung der Daten für den Vergleich von verschiedenen Macroarrays wurde mit

einem von Dr. C. Ammer (Abteilung Sekundärstoffwechsel, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)) in Origin 7.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) geschriebenen Programm durchgeführt. Die Berechnung erfolgte ähnlich wie in der Veröffentlichung von Sreenivasulu *et al.* (2004) beschrieben und betont den Trend der Genexpression, unabhängig von den absoluten Werten. Die Medianzentrierung berücksichtigte alle vier Replikate eines Spotts und die Mittelwertberechnung erfolgte erst anschließend. Durch Medianzentrierung (Eisen *et al.*, 1998) wird der Median der logarithmischen (\log_2) Intensitätsverteilung aller Gene eines Arrays gleich Null gesetzt, um einen Vergleich zwischen verschiedenen Array-Hybridisierungsexperimenten zu ermöglichen. Anschließend erfolgt die Medianzentrierung für jedes Gen (inklusive der vier Replikate) zwischen den verschiedenen Arrays und verschiebt die vorige Zentrierung leicht. Beide Medianzentrierungen wurden alternierend wiederholt, bis die größte Abweichung vom Median kleiner als 0,001 betrug. Für die Auswertung der Versuchsserie des Arrays Eca 01 wurden dafür vier Iterationen und für die Versuchsserie des Arrays Eca 02 fünf Iterationen benötigt. Die Gruppierung von Genen mit ähnlichen Expressionsverhalten und dessen Visualisierung erfolgte mit Hilfe der Software Cluster 3.0 (Eisen *et al.*, 1998, De Hoon *et al.*, 2004) und Java Tree View (Saldanha, 2004).

2.2.12 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Zur bakteriellen Expression des Transkriptionsfaktors EcaERF2 wurde der Vektor pET41 Ek/LIC (s. 2.1.3) verwendet. Durch Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) sollte eine verbesserte Löslichkeit der Expressionsprodukte erreicht werden (Esposito & Chatterjee, 2006). Außerdem wurde durch die ebenfalls vektorcodierten sechs Histidine (His-Tag) die Reinigung mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Porath *et al.*, 1975) an dem Talon-Harz (Clontech, Mountain View, CA, USA) möglich. Der offene Leserahmen bzw. der für die DNA-Bindungsdomäne codierende Bereich wurden zur Einführung geeigneter Überhänge mittels der Polymerasekettenreaktion (s. 2.2.5) amplifiziert. Nach der Ligation in pET41 Ek/LIC und Transformation in *E. coli* NovaBlue Zellen erfolgte die Plasmidisolation und Sequenzierung der rekombinanten Klone. Die Expression erfolgte in *E. coli* Rosetta2 (DE3) Zellen. Dieser Stamm besitzt auf dem pRARE2 Plasmid die tRNA-Gene für die in *E. coli* selten verwendeten Codons (Novy *et al.*, 2001 und 2003).

Zur Proteinexpression wurden 50 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (Kanamycin und Chloramphenicol), das zusätzlich 1 % (w/v) Glukose (Stammlösung 10 % (w/v), sterilfiltriert) enthielt, mit 500 μ l einer Übernachtskultur der Bakterien angeimpft. Diese Starterkultur wurde

bis zu einer optischen Dichte von 0,6-1,0 bei 600 nm (OD_{600}) bei 37 °C und 180 Upm inkubiert und dann zur Inokulation der 1-Liter-Expressionskultur verwendet. Diese wurde erneut bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 28 °C und 180 Upm inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die Proteinsynthese wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid (IPTG) induziert und erfolgte über Nacht bei 15 °C und 180 Upm. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10.000 \times g, 10 min, 4 °C) vom Medium getrennt und bei -80 °C eingefroren. Zur Proteinreinigung wurde das Pellet in Lysispuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 1 % (v/v) Tween 20 und 750 μ g/ml Lysozym (Sigma)) resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte der Aufschluss durch Ultraschall (2 \times 30 sec, 70 % Intensität im Pulsmodus; Sonorex RK-100, Bandelin) und die Abtrennung der Zellfragmente durch Zentrifugation (12.000 \times g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit dem äquilibrierten Talon-Harz versetzt und für 60 min auf Eis bei 30 Upm geschüttelt. Die ungebundenen Proteine wurden durch Zentrifugation (700 \times g, 5 min, 4 °C) und zweimaliges Waschen mit Bindepuffer (= Lysispuffer ohne Tween und Lysozym) entfernt. Nach Aufnahme des Harzes in 2 ml Bindepuffer wurde es in eine Gravitationseinwegssäule (Clontech) überführt und mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer (= Bindepuffer mit 10 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer (= Bindepuffer mit 250 mM Imidazol) in 1 ml Fraktionen. Die das rekombinante Protein enthaltenden Fraktionen wurden über eine PD-10 Säule (GE Healthcare) in 25 mM HEPES/KOH pH 7,2, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 20 % (v/v) Glycerin umgepuffert.

2.2.13 Gelretardationsassays

Gelretardationsassays, auch als EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) bezeichnet, können zum Nachweis der Proteinbindung an DNA verwendet werden (Fried & Crothers, 1981; Garner & Revzin, 1981). Dabei wird der Komplex aus Protein und DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und bei Bindung des Proteins an die Proben-DNA kommt es zu einer Verzögerung im Laufverhalten der DNA. Der Nachweis erfolgte durch radioaktive Markierung der eingesetzten DNA.

Bei Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden wurden die komplementären Oligonukleotidprimer zunächst in TE-Puffer auf 15 pmol/ μ l verdünnt. Für die Primerpaarung wurden jeweils 10 μ l der beiden Primer, 10 μ l Restriktionsenzym-puffer H (50 mM Mg Acetat, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 1 mM Dithioerythrol, pH 7,5) und 70 μ l Wasser in ein

Reaktionsgefäß gegeben und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. In einem 2-Liter Becherglas wurde 1 Liter Wasser zum Kochen gebracht, die Reaktionsgefäße in einem Schwimmer in das Wasser gesetzt und das Wasser für weitere 5 min gekocht. Anschließend wurde das Becherglas zum langsamen Abkühlen in einen Styroporbehälter gestellt und über Nacht im Kühlraum abgekühlt. Die Primerduplicates (Endkonzentration 1,5 pmol/µl) können bei -20 °C für einige Monate gelagert werden.

Zur radioaktiven Markierung der Primerduplicates wurden in ein Reaktionsgefäß auf Eis 16 µl Wasser, 10 µl Primerduplex (25 ng), jeweils 4 µl dCTP, dGTP und dTTP, 5 µl Reaktionspuffer, 2 µl Klenow-Fragment (aus dem Megaprime Kit) und 5 µl [α -P³²]dATP gegeben und dieses für 10 min bei 37 °C inkubiert. Für die Bindungsreaktion wurden 12 µl Wasser, 4 µl 5×EMSA-Bindungspuffer (125 mM HEPES-KOH, pH 7,2, 500 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 50 % Glycerin), 1 µl Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) (100 ng/µl), 800 ng rekombinantes Protein, 1 µl markierter Primer-Duplex (1,5 pmol) in ein Reaktionsgefäß auf Eis gegeben und dieses für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel (5 % in 0,5× TBE) geladen, welches zuvor 30 min bei 125 V äquilibriert wurde. Die Elektrophorese erfolgte für 60 min bei 125 V und RT. Das Polyacrylamidgel wurde auf Filterpapier für eine Stunde bei 80 °C im Geltdrockner getrocknet und über Nacht gegen einen Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics) exponiert.

3 Ergebnisse

3.1 Erstellung einer *E. californica* EST-Datenbank

3.1.1 Erstellung einer cDNA-Bibliothek und EST-Sequenzierung

Suspensionskulturzellen von *E. californica* wurden durch Zugabe von 5 µg/ml Hefeelicitor eliciert. Dosis-Effekt-Kurven hatten gezeigt, dass mit 5 µg/ml Hefeelicitor eine optimale Elicitierung erreicht werden konnte (Gundlach *et al.*, 1992). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und die Gesamt-RNA extrahiert. Für die Erstellung der cDNA-Bibliothek wurde die Poly(A)⁺-RNA für die Zeitpunkte 0,5 Stunden, 1 Stunde, 6 Stunden und 12 Stunden nach Elicitorzugabe isoliert und zu gleichen Anteilen vereinigt. Die Kombination dieser Zeitpunkte sollte es ermöglichen, sowohl cDNAs von schnell induzierten Genen als auch von Genen der Alkaloidbiosynthese, die eine langsamere Kinetik der Transkriptakkumulation zeigen, zu erfassen. Die cDNA-Synthese erfolgte nach den Herstellerangaben des SuperScript Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning Kits (Invitrogen). Die Klonierung der cDNAs in den Phagenvektor war allerdings nicht möglich, da die dazu notwendigen λZipLox *NotI/SalI*-Arme nicht mehr lieferbar waren und Versuche mit älteren, im Labor vorhandenen λZipLox *NotI/SalI*-Armen nicht erfolgreich waren. Deshalb wurden die cDNA-Fragmente direkt in das mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *SalI* linearisierte Plasmid pZL1 kloniert und in *E. coli* XL1-Blue MRF['] Zellen transformiert. Von zufällig ausgewählten Einzelkolonien wurden die Plasmide isoliert. Ein Titer der cDNA-Bibliothek wurde nicht bestimmt, da die cDNA-Fragmente nicht als Phagen vorlagen, sondern direkt in den Vektor pZL1 ligiert wurden. Nach der Isolation wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut und in einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt. Die **Abbildung 3.1** zeigt beispielhaft ein Gelphoto eines solchen Restriktionsverdaus. In der Regel entsprach die größte Bande dem pZL1-Vektor (4,3 kb) und eine oder mehrere weitere Banden, im Falle von internen Schnittstellen, zeigten die klonierte cDNA. Durch den Verdau wird ersichtlich, dass die meisten cDNA-Inserts eine ausreichende Länge hatten. Die durchschnittliche Länge der cDNAs ausgehend von einhundert genauer untersuchten Klonen betrug circa 1400 bp. Daraus wurde geschlossen, dass die Konstruktion der cDNA-Bibliothek gelungen war und für die sich anschließende EST-Sequenzierung geeignet ist. Die meisten näher analysierten Klone (vgl. a. Abschnitt 3.1.4) enthielten sogar die vollständige cDNA-Sequenz und lassen vermuten, dass der Anteil an Volllänge-cDNAs in der Bibliothek relativ groß war.

Für die Sequenzierung wurden nur die cDNAs ausgewählt, deren Länge größer als 600 bp war. Das traf für circa 90 % der cDNA-Inserts zu. Insgesamt wurden 2598 cDNAs von ihrem 5'-Ende ausgehend ansequenziert. Von diesen waren 1980 (76 %) Sequenzierungsläufe erfolgreich. Die durchschnittliche Länge der erhaltenen EST-Sequenz betrug 627 bp.

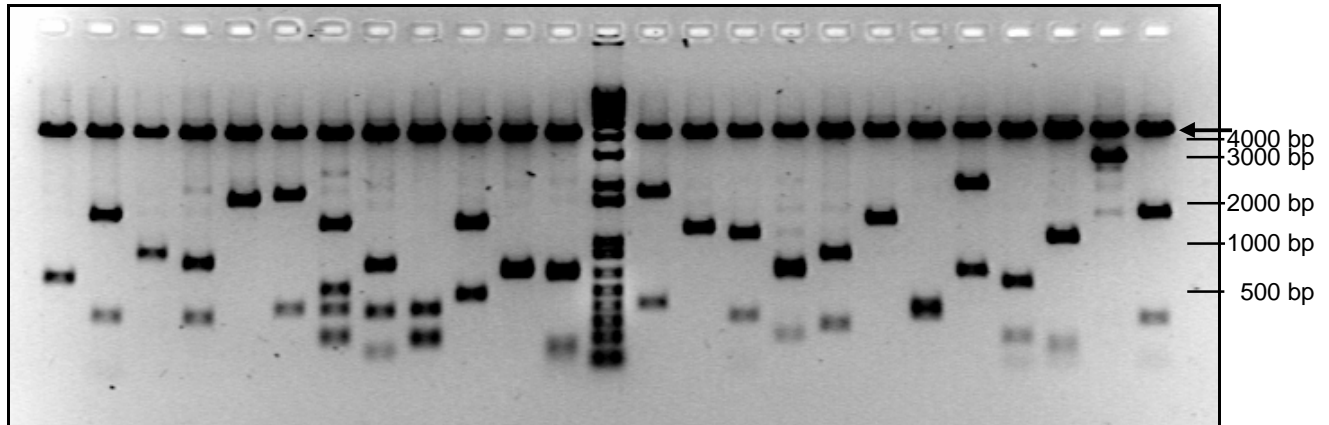


Abb. 3.1: Gelphoto eines mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegels nach Restriktionsverdau der cDNA-Klone. In der Mitte ist der Größenmarker (1kb Plus DNA Ladder) aufgetragen. Die obere, mit einem Pfeil gekennzeichnete Bande entspricht dem Vektor pZL1 (4,3 kb). Die weiteren Banden entsprechen den cDNA-Inserts.

3.1.2 Verknüpfung der EST-Sequenzen zu Contigs

Um aus den Sequenzdaten die redundanten Sequenzen herausfiltern zu können, wurden diese mit Hilfe des Programms SeqMan II (Lasergene, DNASTar Inc.) zu sogenannten Contigs zusammengefasst. Ausgehend von den Rohdaten (*Tracefiles*) wurde zuerst von jeder EST-Sequenz die 5'-gelegende Vektorsequenz (i.d.R. 55 bp) entfernt und das 3'-Ende um qualitativ minderwertigere Sequenzbereiche verkürzt. Die durchschnittliche Länge der prozessierten ESTs betrug 457 bp. Anschließend erfolgten das Zusammenfügen und die Gruppierung der Sequenzen aufgrund ihrer Nukleotidsequenz in die Contigs unter sehr stringenten Bedingungen. Als Parameter wurden eine Mindestlänge der Übereinstimmung (*minimum match size*) von 12 bp und eine Übereinstimmung (*minimum match percentage*) von mindestens 95 % verwendet.

Von den ursprünglich 1980 EST-Sequenzen wurden 24 Sequenzen von der Analyse ausgenommen, weil sie nur aus Vektorsequenz bestanden (19 Sequenzen), ihre Länge nicht ausreichte (vier Sequenzen) oder die Qualität nicht genügte (eine Sequenz). Die verbliebenen 1956 EST-Sequenzen wurden zu 1140 sogenannten Unigenes assembliert. Damit stellen die Unigenes 58,3 % der EST-Sequenzen dar und die Redundanz beträgt 41,7 %. Die Anzahl der

unabhängigen Einzelsequenzen (Singletons) betrug 828 (42,3 %) der Gesamtanzahl. Die restlichen 1128 EST-Sequenzen (57,7 %) befanden sich in 312 Gruppierungen (Cluster), die jeweils eine cDNA (Contig) darstellen.

Zu ganz ähnlichen Ergebnissen kam die Analyse der EST-Sequenzen durch Dr. Stephen Rudd (Turku Centre for Biotechnology, Finnland; <http://sputnik.btk.fi/>). Die **Tabelle 3.1** zeigt die statistischen Daten. Von den insgesamt 1980 EST-Sequenzen wurden 29 von den Analysen ausgeschlossen. Die restlichen 1951 Sequenzen wurden zu 1127 Unigenes (57,8 %) gruppiert. Die Anzahl der Singletons betrug 817 (41,9 5 % der Sequenzen) und die Anzahl der Contigs 310. In diesen 310 Contigs befanden sich 1134 EST-Sequenzen (58,1 %). Die durchschnittliche Clustergröße, die Singletons ausgenommen, betrug 3,7 ESTs pro Cluster. Das anscheinliche Codierungspotential der Sequenzen beträgt 73,7 %. Das restliche Viertel entfällt auf den 5'-untranslatierten Bereich. Die leicht unterschiedliche Anzahl der Unigenes in beiden Analysen lassen sich auf unterschiedliche Parameter während der Gruppierung zurückführen.

Tab. 3.1: Statistik der EST-Analyse (durchgeführt von Dr. S. Rudd)

Anzahl EST-Sequenzen	1980
Gesamtanzahl der Nukleotide	906697
durchschnittliche Vektorkontamination (%)	1,5
durchschnittliche Länge der EST-Sequenzen	457
Anzahl der Cluster	1127
Gesamtanzahl der Nukleotide in Clustern	549006
Anzahl der berücksichtigten EST-Sequenzen während der Unigene-Verknüpfung	1951
Anzahl der Einzelsequenzen in den Unigenes	817
Unigenes aus mehreren Sequenzen	310
durchschnittliche Länge der Unigenes (Nukleotide)	487
durchschnittliche Clustergröße (ohne Singletons) (ESTs/Cluster)	3,7
durchschnittliche Clustergröße (inklusive Singletons) (ESTs/Cluster)	1,7
anscheinliches Codierungspotenzial (%)	73,7
Anzahl der Peptide	1022
Gesamtanzahl der Aminosäuren in Peptiden	134933

3.1.3 Annotation der EST-Sequenzen

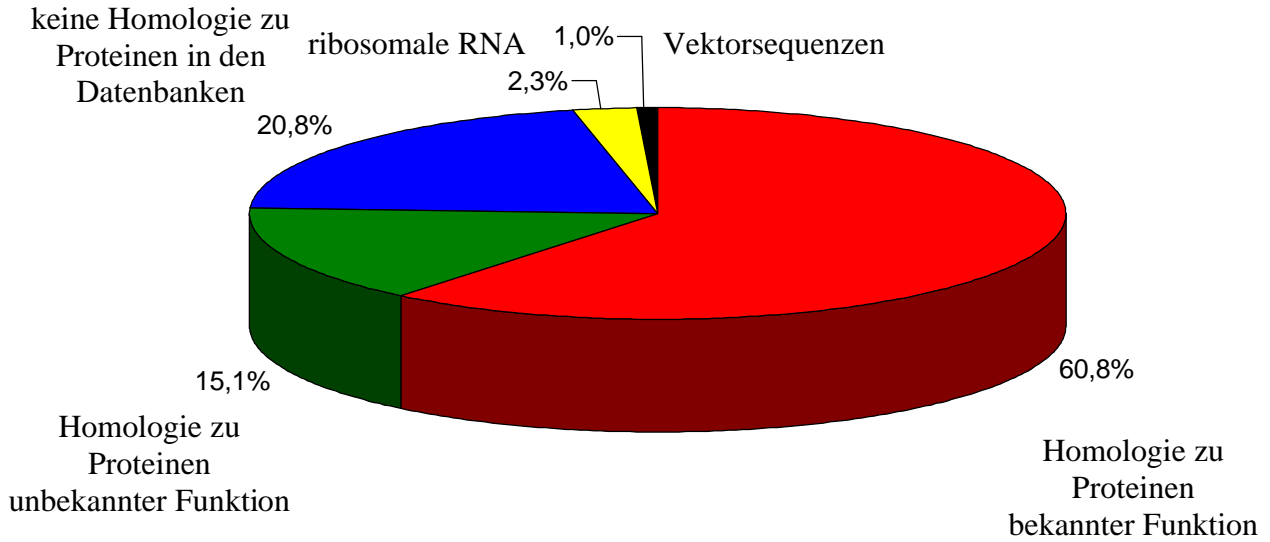
Die Annotation der EST-Sequenzen erfolgte durch Vergleich zu den in den Datenbanken NR (*non-redundant*) und SwissProt vorhandenen Sequenzdaten mittels BLAST X (Altschul *et al.*, 1997). Dazu wird die Nukleotidsequenz zunächst in allen sechs Leserahmen vollständig translatiert und die erhaltenen Aminosäuresequenzen werden mit den Einträgen der Datenbank verglichen. Bei der Annotation wurden drei Kategorien unterschieden: Homologie zu Proteinen bekannter sowie unbekannter Funktion und keine Homologie zu Sequenzen in der Datenbank. Bei den Einträgen von Proteinen mit bekannter Funktion handelt es sich hauptsächlich um biochemisch charakterisierte Proteine, oft aber auch um Sequenzen, die selbst nicht charakterisiert wurden, aber eine große Ähnlichkeit zu diesen aufweisen. In der Gruppe der Proteine mit unbekannter Funktion wurden die unbekannt Proteine, die putativen Proteine und die hypothetischen Proteine zusammengefasst. Für ein unbekanntes Protein liegen cDNA- oder EST-Sequenzen (meistens von *Arabidopsis* oder Reis) vor, jedoch zeigt die Aminosäuresequenz keine Homologie zu Proteinen bekannter Funktion. Putative oder hypothetische Proteine wurden als offene Leserahmen aus den Sequenzen der Genomsequenzierungsprojekte abgeleitet, es existieren aber keine experimentellen Daten für deren Expression *in vivo*.

Die **Abbildung 3.2 a** zeigt, dass 61 % der EST-Sequenzen eine signifikante Homologie zu Proteinsequenzen mit bekannter Funktion besitzen. Ein Anteil von 15 % der ESTs zeigt Homologie zu Proteinen mit noch unbekannter Funktion, und weitere 21 % der Sequenzen besitzen keine homologen Sequenzen in den Datenbanken. Ein kleiner Anteil der ESTs ist identisch mit Sequenzen ribosomaler RNA (2 %) oder identisch mit Vektorsequenzen (1 %). Durch Rekombinationsereignisse während der Klonierung kann es dazu kommen, dass Vektorstücke so zusammengefügt werden, dass sie mit dem ursprünglichen Klonierungsvektor nicht mehr viel gemeinsam haben, aber durch die Vektorerkennungsprogramme nicht als solche erkannt werden.

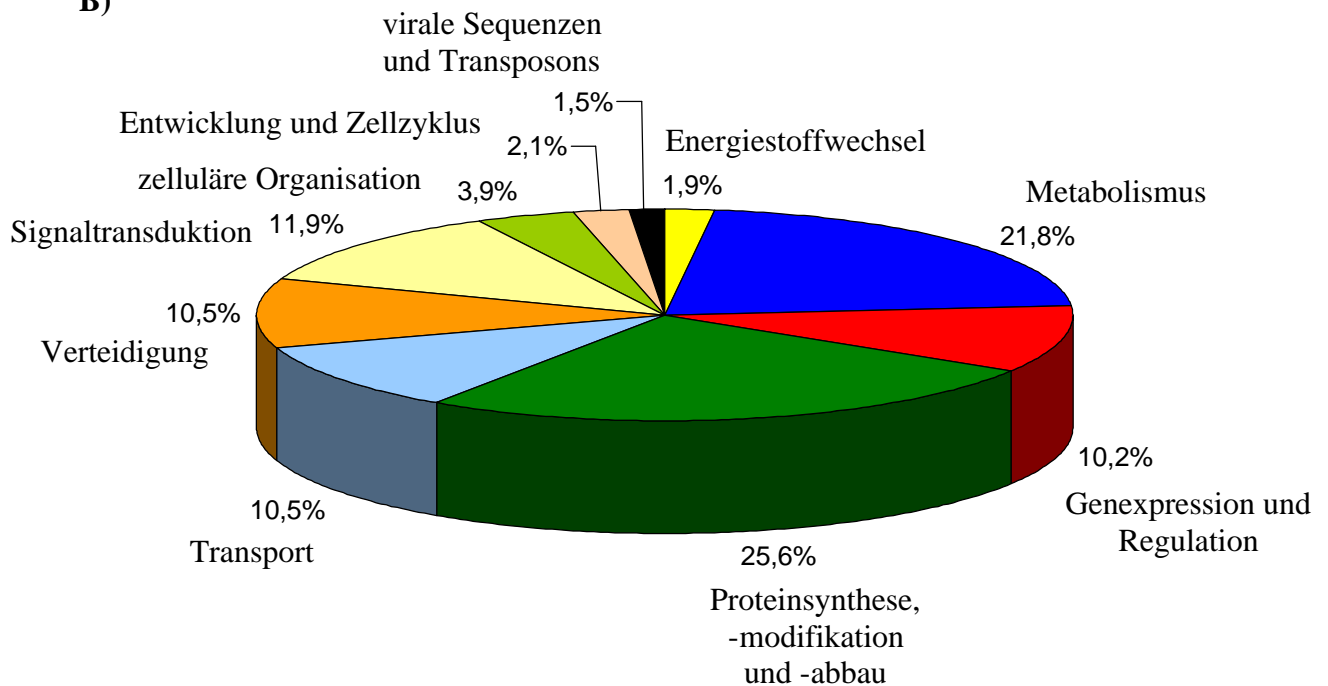
Die weitere funktionelle Aufteilung der Sequenzen mit Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion ist ein **Abbildung 3.2 b** zu sehen. Ein Großteil der Sequenzen (26 %) gehört in die Kategorie Proteinsynthese, Proteinmodifikation und Proteinumsatz. Dazu zählen Sequenzen mit Homologie zu Translationsinitiations- und Elongationsfaktoren, ribosomalen und faltungshelfenden Proteinen, *N*-Acetylglucosaminyltransferasen, Proteinen der Ubiquitinierung und des Proteasoms sowie Proteasen. Mit 22 % der Sequenzen die zweitgrößte Kategorie ist der Metabolismus. Hierzu zählen alle Enzyme des generellen Metabolismus als auch des Sekundärstoffwechsels wie z. B. Cytochrom-P450-Enzyme (29 Sequenzen),

Methyltransferasen (18 Sequenzen) und Glycosyltransferasen (13 Sequenzen). Der Energiestoffwechsel, zu dem z. B. die Komponenten der Atmungskette, die ATP-Synthese, die Glykolyse und der Zitratzyklus gezählt wurden, macht mit 2 % nur einen geringen Anteil der EST-Sequenzen aus. Die vier Kategorien Genexpression und Regulation, Transport, Signaltransduktion sowie Verteidigung sind mit 10 bis 12 % der Sequenzen nahezu gleich groß. Zur Kategorie Genexpression und Regulation wurden alle Sequenzen mit Homologie zu Transkriptionsfaktoren, Proteinen des Spleißosoms, der Transkription und Prozession der RNA gezählt. Die Kategorie Transport umfasst Komponenten des intra- und interzellulären Transportes wie Proteine des Vesikeltransportes, Ionenpumpen- und Kanäle und ABC (*ATP-binding cassette*) -Transporter. Zur Kategorie Signaltransduktion wurden beispielsweise Proteinkinasen und -phosphatasen, Rezeptorkinasen, Calmodulin, Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinasen, Calmodulin-abhängige Proteinkinasen und Komponenten der Phytohormonsynthese und deren Signaltransduktion zusammengefasst. In die Kategorie Verteidigung fallen z. B. PR-Proteine, Chitinasen, Defensine, Dehydrine, Peroxidasen, Laccasen, Glutation-Reduktasen, Glutathion-S-Transferasen, Miraculine, Syntaxine und Xyloglucanase-Inhibitoren. Auf die drei Kategorien zelluläre Organisation, Entwicklung und Zellzyklus sowie virale Sequenzen entfallen nur kleinere Anteile der EST-Sequenzen von 4, 2 und 1,5 %. Zur Kategorie zelluläre Organisation wurden z. B. strukturgebende Proteine wie Actin und Tubulin gerechnet. In der Kategorie Entwicklung und Zellzyklus wurden Proteine der Zellteilung und der DNA-Synthese wie Cycline, DNA-Helicase, DNA-Topoisomerase und DNA-Polymerase zusammengefasst. In der Kategorie virale Sequenzen befinden sich hauptsächlich EST-Sequenzen mit Homologie zu RNA-abhängige DNA-Polymerasen und Polyproteinen. Weiterhin auffällig ist, dass unter den erhaltenen Sequenzen keine Komponenten des Photosyntheseapparates gefunden wurden. Das zeigt, dass die verwendete Suspensionszellkultur, wie auch die hell gelbliche Farbe schon vermuten lässt, photosynthetisch nicht aktiv ist.

A)



B)



C)

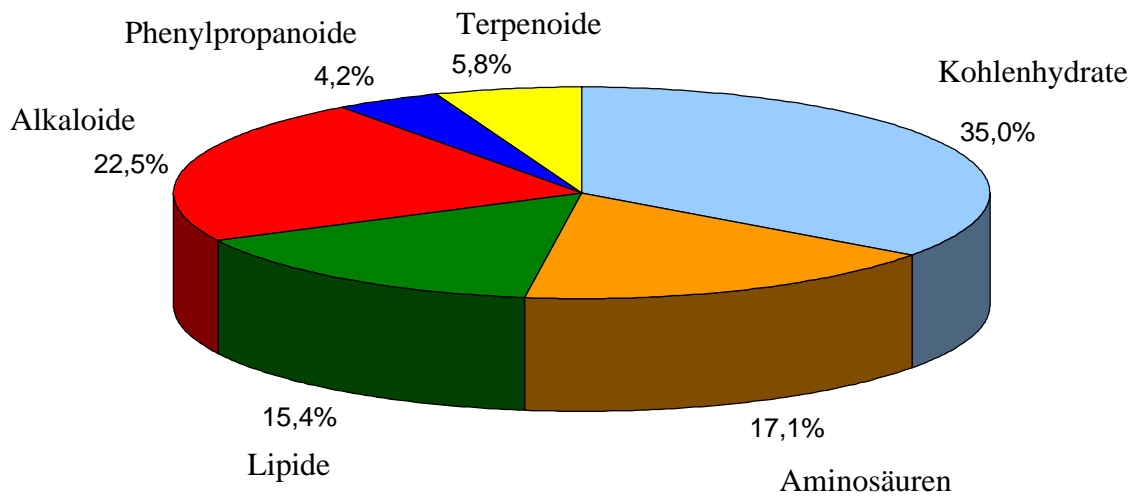


Abb. 3.2: Funktionelle Annotation der EST-Sequenzen aufgrund ihrer Homologie. Als Schwellenwert für eine signifikante Homologie wurde ein Erwartungswert (*E-value*) kleiner als 1×10^{-10} festgelegt.

A) Aufteilung aller Sequenzen aufgrund ihrer Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion, mit unbekannter Funktion und ohne Homologie zu Sequenzen in den Datenbanken.

B) Aufteilung der Sequenzen mit Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion. Folgende funktionelle Kategorien wurden verwendet: Energiestoffwechsel, Metabolismus, Genexpression und Regulation, Proteinsynthese, -modifikation und -abbau, Transport, Verteidigung, Signaltransduktion, zelluläre Organisation, Entwicklung und Zellzyklus sowie virale Sequenzen und Transposons.

C) Aufteilung der Sequenzen mit Homologie zu Proteinen des Metabolismus. Die Unterteilung erfolgte in Metabolismus der Kohlenhydrate, Aminosäuren, Lipide, Alkaloide, Phenylpropanoide und Terpenoide.

Die **Abbildung 3.2 c** zeigt die weitere Aufteilung der EST-Sequenzen der Kategorie Metabolismus in die Unterkategorien Kohlenhydrate, Aminosäuren, Lipide, Alkaloide, Phenylpropanoide und Terpenoide. Ungefähr zwei Drittel der Sequenzen (67,5 %) entfallen auf den Primärmetabolismus (Synthese von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Lipiden) und das restliche Drittel (32,5 %) auf den Sekundärmetabolismus (Synthese von Alkaloiden, Phenylpropanoiden und Terpenoiden). Die größte Kategorie stellt mit 35 % der Metabolismus von Kohlenhydraten dar. Der Metabolismus von Aminosäuren und Lipiden stellt einen Anteil von 17 bzw. 15 %. Die auffällig größte Kategorie des Sekundärstoffwechsels ist mit 22,5 % der EST-Sequenzen der Metabolismus der Alkaloide. Der Metabolismus von Phenyl-

propanoiden und Terpenoiden macht mit 4 % bzw. 6 % nur einen kleineren Anteil des Sekundärstoffwechsels aus.

Die **Tabelle 3.2** zeigt die 25 Cluster mit den am häufigsten redundanten EST-Sequenzen aus der cDNA-Bibliothek. Der mit Abstand größte Cluster mit 43 Sequenzen (2,2 % der ESTs) zeigte Homologie zu einem „mutmaßlich an der Seneszenz beteiligten Protein“ aus der Erbse (*Pisum sativum*). Ein direkter Sequenzvergleich der Nukleotidsequenzen mit BLAST N zeigte jedoch, dass es sich bei diesen cDNAs um die 26 S ribosomale RNA handelt. In der Abb. 3.2 A ist diese Sequenz unter den 2.3 % der ribosomalen RNAs zu finden. Der zweitgrößte Cluster und der dreizehntgrößte Cluster beinhalten zusammen 27 Sequenzen, die Homologie zu einem Miraculin-Homolog zeigen, der auch als Kunitz-Typ Trypsin-Inhibitor oder *tumor-related protein* aus Tabak (*N. tabacum*) in der Datenbank gefunden wurde. Miraculin ist ein pflanzliches Protein, welches geschmacksmodifizierend wirkt. Es verwandelt einen sauren Geschmack in einen süßen und wurde zuerst aus den Beeren von *Richadella dulcifera* isoliert (Brouwer *et al.*, 1968). Miraculin-ähnliche cDNAs wurden auch als durch MeJA induzierbare Transkripte mit einer möglichen Funktion in der Verteidigung beschrieben (Tsukuda *et al.*, 2006).

Weitere sehr abundante cDNAs, welche sehr häufig sequenziert wurden, zeigen große Ähnlichkeit zu dem Elongationsfaktor 1- α , dem 60 S ribosomalen Protein L1 und dem 60 S ribosomalen Protein L10A, einem möglichen Phosphat-Transporter, der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Dehydrin, und einigen unbekannt Proteinen. Zwei cDNAs, die durch zehn bzw. acht ESTs repräsentiert werden, hatten keinerlei Homologie zu Sequenzen in den Datenbanken. EST-Sequenzen mit Homologie zu einem Transkriptionsfaktor der AP2/ERF-Familie befanden sich in einem Cluster aus neun Sequenzen. Dieser Transkriptionsfaktor wurde später in EcaERF2 (siehe 3.1.5 und Tab. 3.4) benannt und auf seine mögliche Beteiligung an der Regulation der Alkaloidbiosynthese untersucht (siehe 3.4).

Tab. 3.2: Auflistung der am häufigsten vorkommenden ESTs nach der Clusteranalyse. Für jeden der 25 größten Cluster ist die Annotation (durch BLAST X Vergleich), die Zugangsnummer des Proteins mit der größten Homologie mit dazugehörigen Erwartungswert (*E-value*), die Clustergröße (Anzahl der ESTs), die Nummer des Contigs (in SeqMan II) und der Name (ID), der für die Expressionsanalysen verwendeten cDNA, angegeben.

Annotation	Zugangsnummer	<i>E-value</i>	Clustergröße	Contig (ID)
<i>putative senescence-associated protein</i> 26S ribosomale RNA	BAB33421	3,00E-81 (BLAST X)	43	463 (-)
	AF389249	0,00 (BLAST N)		
<i>tumor-related protein</i> Miraculin-Homolog Kunitz-Typ Trypsininhibitor	AAC49969	1,00E-36	17	470 (11A05)
Elongationsfaktor 1- α	BAC23049	0,00	13	465 (27C12)
unbekanntes Protein (<i>A. thaliana</i>)	NP_565644	4,00E-45	12	471 (24F09)
60 S ribosomales Protein L1	ABE92091	7,00E-120	11	474 (14H04)
<i>putative GTPase</i> (<i>A. thaliana</i>)	AAF27009	2,00E-22	11	473 (01G01)
unbekanntes Protein (<i>A. thaliana</i>)	AAL06795	2,00E-83	11	1 (11A09)
RNA Guanylyltransferase (<i>A. thaliana</i>)	NP_974263	2,00E-86	11	472 (07F08)
naszierendes Polypeptid- assoziiertes Komplex	BAB90246	3,00E-43	10	475 (19H03)
unbekanntes Protein (<i>A. thaliana</i>)	NP_564651	1,00E-10	10	3 (06D09)
Phosphat-Transporter	AAK01938	4,00E-56	10	69 (12A11)
Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	CAA42905	9,00E-79	10	42 (24G10)
<i>tumor-related protein</i> Miraculin-Homolog Kunitz-Typ Trypsininhibitor	AAC49969	1,00E-40	10	478 (07E06)
keine Homologie	---	---	10	479 (14B09)
<i>ethylene responsive element binding protein C3</i> (<i>Capsicum annuum</i>) <i>ethylene response factor 4</i> (<i>Lycopersicon esculentum</i>) <i>ethylene-responsive transcription factor 4</i> (NtERF4) (<i>N. tabacum</i>)	AAX20036	0,21	9	100 (18F08)
	AAO34706	0,4		
	Q40478	6,9		

Tab. 3.3: (Fortsetzung)

<i>leucine-rich repeat</i> (LRR) Protein	AAP23944	7,00E-82	9	476 (08E11)
60S ribosomales Protein L10A	AAW50982	1,00E-59	8	484 (20A11)
Δ 12-Fettsäure-Desaturase (FAD2)	ABA41034	1,00E-70	8	482 (07F10)
keine Homologie	---	---	8	485 (14C01)
Cystein Proteinase RD21A	BAD95392	2,00E-125	8	486 (07C07)
<i>translationally controlled tumour protein</i> (TCTP)	ABE80611	2,00E-55	8	480 (06C09)
unbekanntes Protein (<i>A. thaliana</i>)	NP_564239	1,00E-49	8	2 (27B08)
Dehydrin (cor29, cor47, ERD10, LTI45)	AAZ83586	1,00E-04	8	16 (07A05)
putatives Arginin-Aspartat-reiches RNA-Bindungsprotein	AAM91771	3,00E-55	8	144 (05B03)
unbekanntes Protein (<i>A. thaliana</i>)	NP_171946	9,00E-35	8	32 (25C03)

3.1.4 Identifizierung von cDNA-Sequenzen für Enzyme der Alkaloidbiosynthese

Einige der EST-Sequenzen zeigten auffällig hohe Homologie zu bekannten Enzymen der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese. Diese cDNAs wurden unter Verwendung von sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern vollständig sequenziert. Die **Tabelle 3.3** listet die cDNA-Klone mit ihrer jeweiligen höchsten Homologie mit Angabe der Ähnlichkeit in Prozent Identität. Die vollständigen cDNA-Sequenzen sowie die daraus abgeleiteten, translatierten Proteinsequenzen befinden sich im Anhang (siehe Abb. 7.4-7.12).

Vier EST-Sequenzen zeigten eine hohe Homologie zur 3'-Hydroxy-*N*-Methyl-(*S*)-Coclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (4'-OMT). Die vollständige cDNA Eca 05F07 hat eine Länge von 1372 Nukleotiden und codiert für ein Protein mit 353 Aminosäuren und einer berechneten Masse von 39,2 kDa. Auf Aminosäureebene besteht 75 % Identität zur 4'-OMT 2 aus *P. somniferum*. Die EST-Sequenz Eca 17E05 zeigte eine Homologie zur (*R,S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6-OMT). Die Volllänge cDNA hat eine Länge von 1298 Nukleotiden und codiert für ein Protein mit 350 Aminosäuren und einer berechneten Masse von 39,3 kDa. Die Proteinsequenz besitzt 74 % Identität zur 6-OMT aus *P. somniferum*. Beide *O*-Methyltransferasen wurden im Rahmen der Diplomarbeit von N. Grobe heterolog in *E. coli* exprimiert und funktionell charakterisiert (Grobe, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass es

sich bei den beiden *O*-Methyltransferasen um funktionelle 4'-OMT und 6-OMT der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese handelt.

Die beiden EST-Sequenzen Eca 21G08 und Eca 24B04 zeigten Homologie zur (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT). Die weitere Sequenzierung ergab, dass beide cDNAs nicht der Volllänge-Sequenz entsprachen. Die cDNA Eca 21G08 war am 5'-Ende verkürzt und der cDNA Eca 24B04 fehlte das Stopcodon am 3'-Ende. Beide Sequenzen waren über eine Länge von 876 Nukleotiden (292 Aminosäuren) miteinander identisch. Nach 5'- und 3'-RACE konnte eine cDNA von 1445 Nukleotiden assembliert werden (s. a. Grobe, 2005). In der Diplomarbeit von N. Grobe wird die Länge mit 1475 Nukleotiden angegeben. Diese beinhaltet jedoch noch die 30 bp lange Smart IIA Oligonukleotidprimersequenz. Mittels sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer gelang die Amplifikation der vollständigen cDNA durch RT-PCR ausgehend von der Gesamt-RNA. Der offene Leserahmen hat eine Länge von 1062 Nukleotiden und codiert für ein Protein mit 353 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 41,1 kDa. Die Aminosäuresequenz zeigt 70 % Identität zur CNMT aus *P. somniferum* und ist zu 61 % bzw. 60 % der Aminosäuren identisch mit der CNMT aus *C. japonica* bzw. *T. flavum*.

Die vollständige cDNA Eca 04E05 hat eine Länge von 1391 Nukleotiden und enthält einen offenen Leserahmen von 1068 Nukleotiden, der für ein Protein mit 355 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 41,3 kDa codiert. Die größte Homologie mit 74 und 70 % Identität besteht zu zwei putativen „Coclaurin-*N*-Methyltransferasen“ aus *A. thaliana* (At4g33110 und At4g33120). Die Homologie zu den CNMT-Sequenzen der Alkaloidbiosynthese aus *C. japonica*, *T. flavum* und *P. somniferum* beträgt jedoch nur 55 bis 52 %. Zur (*S*)-Tetrahydroprotoberberin *cis-N*-Methyltransferase (TNMT) aus *P. somniferum* besteht eine Homologie von 48 %. Außerdem zeigt die Aminosäuresequenz von Eca 04E05 eine Homologie von bis zu 45 % zu den bakteriellen SAM-abhängigen Cyclopropanfettsäuresynthasen.

Tab. 3.3: cDNA-Sequenzen mit Homologie zu bekannten Enzymen der Benzylisochinolin-alkaloidbiosynthese. Verglichen wurden die abgeleiteten Proteinsequenzen der vollständig sequenzierten cDNA-Klone (BLAST P).

cDNA	% Identität	Funktion
4'-OMT Eca 05F07 Eca 02F09 Eca 06E05 Eca 20G11	75	3'-Hydroxy- <i>N</i> -Methyl-(<i>S</i>)-Coclaurin-4'- <i>O</i> -Methyltransferase 2 (4'-OMT) [<i>P. somniferum</i>]
6-OMT Eca 17E05	74	(<i>R,S</i>)-Norcoclaurin-6- <i>O</i> -Methyltransferase (6-OMT) [<i>P. somniferum</i>]
CNMT Eca 21G08 Eca 24B04	70	(<i>S</i>)-Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase (CNMT) [<i>P. somniferum</i>]
NMT Eca 04E05	74	“Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase” At4g33110 [<i>A. thaliana</i>]
	70	“Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase” At4g33120 [<i>A. thaliana</i>]
	55	(<i>S</i>)-Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase [<i>T. flavum</i>]
	55	(<i>S</i>)-Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase [<i>C. japonica</i>]
	52	(<i>S</i>)-Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase [<i>P. somniferum</i>]
	48	(<i>S</i>)-Tetrahydroprotoberberin- <i>cis-N</i> -Methyltransferase [<i>P. somniferum</i>]
CYP719A2 Eca 13F06 Eca 15H09	99	(<i>S</i>)-Stylopin-Synthase CYP719A2 [<i>E. californica</i>] BAD98250
	84	(<i>S</i>)-Stylopin-Synthase CYP719A3 [<i>E. californica</i>] BAD98249
	79	(<i>S</i>)-Stylopin-Synthase CYP719A13 [<i>A. mexicana</i>] ABR14721
	65	(<i>S</i>)-Canadin-Synthase CYP719A1 [<i>C. japonica</i>] BAB68769
	65	(<i>S</i>)-Canadin-Synthase CYP719A4 [<i>T. flavum</i>] AAU20771
	60	(<i>S</i>)-Cheilanthifolin-Synthase CYP719A14 [<i>A. mexicana</i>] ABR14722
	60	CYP719A18 [<i>C. japonica</i>] BAF98470
	60	CYP719A5 [<i>E. californica</i>] diese Arbeit
	57	CYP719A19 [<i>C. japonica</i>] BAF98471
51	Salutaridin-Synthase CYP719B1 [<i>P. somniferum</i>] ABR14720	
CYP719A5 Eca 02E03 Eca 07E01 Eca 10D07 Eca 27E12	78	(<i>S</i>)-Cheilanthifolin-Synthase CYP719A14 [<i>A. mexicana</i>] ABR14722
	63	(<i>S</i>)-Canadin-Synthase CYP719A4 [<i>T. flavum</i>] AAU20771
	62	(<i>S</i>)-Canadin-Synthase CYP719A1 [<i>C. japonica</i>] BAB68769
	61	(<i>S</i>)-Stylopin-Synthase CYP719A2 [<i>E. californica</i>] BAD98250
	60	CYP719A2 [<i>E. californica</i>] diese Arbeit
	60	Salutaridin-Synthase CYP719B1 [<i>P. somniferum</i>] ABR14720
	62	(<i>S</i>)-Stylopin-Synthase CYP719A13 [<i>A. mexicana</i>] ABR14721
	59	(<i>S</i>)-Stylopin-Synthase CYP719A3 [<i>E. californica</i>] BAD98249
	58	CYP719A18 [<i>C. japonica</i>] BAF98470
	55	CYP719A19 [<i>C. japonica</i>] BAF98471
CPR Eca 04B08	100	NADPH:Cytochrom-P450-Reduktase [<i>E. californica</i>]
CYP82B1 Eca 12C10	100	CYP82B1 [<i>E. californica</i>] AAC39454

Tab. 3.1: (Fortsetzung)

CYP82N1 Eca 26H09 Eca 13E12 Eca 16A04 Eca 20C09	93	CYP82N2 [<i>E. californica</i>] diese Arbeit
	50	CYP82D3 [<i>C. japonica</i>] BAF98469
	48	CYP82R1 [<i>C. japonica</i>] BAF98472
	49	CYP82C1 [<i>Glycine max</i>] AAB94590
	46	CYP82A3 [<i>Glycine max</i>] CAA71876
	42	CYP82A1 [<i>Pisum sativum</i>] AAC49188
	42	CYP82P1 [<i>E. californica</i>] diese Arbeit
	44	CYP82B1 [<i>E. californica</i>] AAC39454
CYP82N2 Eca 08B11 Eca 15H11 Eca 23B01 Eca 23G05	93	CYP82N1 [<i>E. californica</i>] diese Arbeit
	48	CYP82R1 [<i>C. japonica</i>] BAF98472
	50	CYP82D3 [<i>C. japonica</i>] BAF98469
	48	CYP82C1 [<i>Glycine max</i>] AAB94590
	45	CYP82A3 [<i>Glycine max</i>] CAA71876
	42	CYP82A1 [<i>Pisum sativum</i>] AAC49188
	41	CYP82P1 [<i>E. californica</i>] diese Arbeit
	44	CYP82B1 [<i>E. californica</i>] AAC39454
CYP82P1 Eca 23D07 Eca 01F12 Eca 03H06	49	CYP82D3 [<i>E. californica</i>] BAF98469
	47	CYP82C1 [<i>Glycine max</i>] AAB94590
	46	CYP82A4 [<i>Glycine max</i>] CAA71877
	45	CYP82A3 [<i>Glycine max</i>] CAA71876
	42	CYP82N1 [<i>E. californica</i>] diese Arbeit
	41	CYP82N2 [<i>E. californica</i>] diese Arbeit
	41	CYP82A1 [<i>Glycine max</i>] AAC49188
	43	CYP82E5 [<i>N. tabacum</i>] ABX56037
	42	CYP82E1 [<i>N. tabacum</i>] AAK62347
	39	CYP82R1 [<i>C. japonica</i>] BAF98472
	41	CYP82B1 [<i>E. californica</i>] AAC39454

Weitere sechs EST-Sequenzen besaßen Ähnlichkeit zum Methylendioxybrückenenzym CYP719A1 der Berberinbiosynthese aus *C. japonica* (Ikezawa *et al.*, 2003). Die vollständige Sequenzierung zeigte, dass es sich um zwei verschiedene cDNAs handelte, von denen die eine viermal und die andere zweimal als EST erhalten wurde. Beide Sequenzen wurden zur Annotation an Dr. David R. Nelson (University of Tennessee, Memphis, USA) geschickt und in CYP719A2 (Eca 13F06) und CYP719A5 (Eca 02E03) benannt. Die cDNA von CYP719A2 hat eine Länge von 1705 Nukleotiden mit einem offenen Leserahmen von 1467 Nukleotiden. Die abgeleitete Proteinsequenz ist 488 Aminosäuren lang mit einer berechneten Masse von 55,5 kDa. Die cDNA von CYP719A5 hat eine Gesamtlänge von 1785 Nukleotiden, von denen 1473 bp für ein Protein mit 490 Aminosäuren und einer theoretischen Masse von 55,2 kDa codieren. Die Aminosäuresequenz von CYP719A2 unterscheidet sich nur in einer Aminosäure an Position 329 (Lysin anstelle von Arginin) von der CYP719A2-Sequenz (BAD98250), welche von der Arbeitsgruppe um Fumihiko Sato (Kyoto University, Japan) in

die Datenbank gestellt wurde und zeigt 62 % Identität zu CYP719A1. CYP719A5 ist ebenfalls zu 62 % homolog zu CYP719A1 und hat 61 % identische Aminosäuren mit CYP719A2. Untereinander sind die Proteinsequenzen von CYP719A2 und CYP719A5 zu 60 % ihrer Aminosäuren identisch. Die Arbeitsgruppe von F. Sato hat mit CYP719A3 (BAD98249) noch eine weitere Proteinsequenz aus *E. californica* mit 84 % Homologie zu CYP719A2 und 59 % Homologie zu CYP719A5 veröffentlicht. CYP719A2 und CYP719A3 zeigen beide Stylopin-Synthase-Aktivität (Ikezawa *et al.*, 2007). Mit dem Namen CYP719A4 wurde die Canadin-Synthase aus *T. flavum* (AAU20771) publiziert (Samanani *et al.*, 2005). Ferner leiten sich aus den EST-Sequenzen des *Floral Genome Projects* (FGP; Penn State University, USA) die vollständige Sequenz von CYP719A9 und die partiellen Proteinsequenzen von CYP719A10, CYP719A11 und CYP719A12 ab (Dr. D. Nelson; <http://drnelson.utm.edu/biblioD.html>).

Desweiteren wurden die Volllänge-Sequenzen von drei cDNAs der CYP82-Familie, zu denen auch CYP82B1 aus *E. californica* (Pauli & Kutchan, 1998) gehört bestimmt. Sie wurden ebenfalls von Dr. D. Nelson annotiert und als CYP82N1, CYP82N2 und CYP82P1 benannt. Für CYP82N1 und CYP82N2 wurden jeweils vier und für CYP82P1 drei ESTs aus der cDNA-Bibliothek sequenziert. CYP82N1 und CYP82N2 sind untereinander auf der Aminosäureebene zu 93 % identisch und zeigen 41 bzw. 42 % Homologie zu CYP82P1. Weiterhin weisen sie 48 bis 50 % Identität zu CYP82D3 und CYP82R1 aus *C. japonica* auf und zeigen 41 bis 49 % Homologie zu den Verwundungs- und Elicitor-induzierbaren Cytochrom-P450-Enzymen der CYP82A-Familie aus Soja (*Glycine max*) und Erbse (*Pisum sativum*). Die Homologie zu CYP82B1 aus *E. californica* beträgt 41 bis 44 %. Zahlreiche CYP450-Sequenzen aus den Sequenzierprojekten von *Vitis vinifera* (Wein) und *Medicago truncatula* (Gestutzter Schneckenklee) zeigen ebenfalls Ähnlichkeit zu CYP82N1, CYP82N2 und CYP82P1.

Die cDNA-Sequenzen Eca 04B08 und Eca 12C10 waren identisch mit der NADPH: Cytochrom-P450-Reduktase (Rosco *et al.*, 1997) bzw. dem Cytochrom-P450-Enzym CYP82B1 (Pauli & Kutchan, 1998) aus *E. californica*. Interessanterweise wurden keine EST-Sequenzen für das Berberinbrückenenzym (Dittrich & Kutchan, 1991) und die (S)-N-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (CYP80B1) (Pauli & Kutchan, 1998) in der EST-Datenbank gefunden.

3.1.5 Identifizierung von cDNA-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren

Da für diese Arbeit besonders die Regulation der Alkaloidbiosynthese als Folge eines Stresssignals von Interesse war, wurden die EST-Sequenzen genauer auf potentielle Transkriptionsfaktoren untersucht. In **Tabelle 3.4** sind EST-Sequenzen mit Homologie zu Transkriptionsfaktoren verschiedener Familien mit Angabe der Homologie in Prozent Identität aufgelistet. Der Homologievergleich erfolgte durch BLAST X der partiellen cDNA-Sequenzen gegen die Proteinsequenzen in den Datenbanken NR und SwissProt.

Insgesamt dreizehn EST-Sequenzen zeigten Homologie zu Transkriptionsfaktoren der AP2/ERF-Familie. Sie gehören zu drei verschiedenen cDNAs und wurden im Verlauf der Arbeit in EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 umbenannt. EcaERF2 wurde durch neun EST-Sequenzen repräsentiert, während für EcaERF1 und EcaERF3 jeweils zwei ESTs sequenziert wurden. Die EST-Sequenzen von EcaERF1 zeigten die größte Ähnlichkeit zu CEF1 (*callus-expressing factor 1*) aus *N. tabacum* und JERF1 (*jasmonate and ethylene response factor 1*) aus *Lycopersicon esculentum*. Die neun EST-Sequenzen von EcaERF2 zeigten anfangs nur eine sehr geringe Homologie zu EREBP-Transkriptionsfaktoren aus Tabak, weil sie der vor der DNA-Bindungsdomäne liegenden Sequenz entsprechen und nur das AP2/ERF-Motiv in diesen Proteinen stark konserviert ist. Die weitere Sequenzierung der vollständigen cDNA (siehe 3.4.1) ergab aber eine eindeutige Zugehörigkeit zu der AP2/ERF-Familie von Transkriptionsfaktoren. Die beiden EST-Sequenzen von EcaERF3 hatten Ähnlichkeit zu RAP2.6 aus *A. thaliana*, wobei beiden cDNAs circa 300 Basenpaare des 5'-Ende fehlten.

Homologie zu Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie zeigten insgesamt sieben EST-Sequenzen, die zu vier individuellen cDNAs gehören. Vier ESTs hatten Ähnlichkeit zu WRKY6 und WRKY42 aus *A. thaliana*. Weitere drei EST-Sequenzen (Eca 02A08, Eca 06A10 und Eca 16A03) besaßen Ähnlichkeit zu MYB-Transkriptionsfaktoren verschiedener Pflanzenarten. Die Sequenz Eca 26F07 zeigte eine Homologie mit 43 und 44 % Identität zu den G-Box-bindenden bZIP-Transkriptionsfaktoren TAF-2 aus *N. tabacum* und GBF 1 aus *C. roseus*. Ein weiterer EST (Eca 10D05) zeigte ebenfalls Ähnlichkeit zu G-Box-bindenden bZIP-Transkriptionsfaktoren, jedoch mit dem nicht-codierenden (*antisense*) Strang der cDNA.

Tab. 3.4: cDNA-Klone mit Homologie zu Transkriptionsfaktoren. Verglichen wurden die EST-Sequenzen mit den Proteinsequenzen in den Datenbanken NR und SwissProt.

cDNA	% Identität	Transkriptionsfaktor
EcaERF1	66	<i>putative ethylene responsive element binding protein</i> [<i>Gossypium hirsutum</i>] AAX20013
Eca 08G07	69	<i>ethylene response factor</i> [<i>Manihot esculenta</i>] AAX84670
Eca 05F10	68	<i>callus-expressing factor</i> [<i>N. tabacum</i>] AAP40022
	66	Transkriptionsfaktor JERF1 [<i>L. esculentum</i>] AAK95687
EcaERF2	48	<i>ethylene responsive element binding protein C3</i> [<i>Capsicum annuum</i>] AAX20036
Eca 18F08		
Eca 03C01	36	<i>Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 1</i> [<i>N. tabacum</i>] AAG43545
Eca 04D10		
Eca 09A03	50	<i>ethylene-responsive element binding factor</i> [<i>Gossypium hirsutum</i>] AAO59439
Eca 10A04		
Eca 16F03		
Eca 18A11	45	<i>ethylene response factor 4</i> [<i>L. esculentum</i>] AAO34706
Eca 26H09	27	<i>ethylene-responsive transcription factor 5 (EREBP-4, NtERF4)</i> [<i>N. tabacum</i>] Q40478
Eca 27B06		
EcaERF3	52	<i>AP2/ERF domain-containing transcription factor</i> [<i>Populus trichocarpa</i>] EEE90708
Eca 13G11		
Eca 13G10	95	RAP2.6 [<i>A. thaliana</i>] AAC49772
Eca 22D02	38	Transkriptionsfaktor WRKY4 [<i>Petroselinum crispum</i>] AAG35658
Eca 10A01	93	Transkriptionsfaktor WRKY6 [<i>A. thaliana</i>] AAK01128
Eca 09C06	94	Transkriptionsfaktor WRKY42 [<i>A. thaliana</i>] Q9XEC3
Eca 17G02	94	Transkriptionsfaktor WRKY1 [<i>Coffea canephora</i>] ABC87936
Eca 23B04		
Eca 06D12	42	Transkriptionsfaktor WRKY31 [<i>A. thaliana</i>] Q93WT0
Eca 20A05	52	DNA-binding protein NtWRKY3 [<i>N. tabacum</i>] BAA77358
Eca 02A08	90	Transkriptionsfaktor MYB68 [<i>A. thaliana</i>] T51673
Eca 06A10	42	Os05g0126400 [<i>Oryza sativa</i>] MYB DNA binding domain BAF16441
Eca 16A03	64	Transkriptionsfaktor MYB50 [<i>Glycine max</i>] ABH02824
Eca 10D05	47	<i>G-box binding factor</i> bZIP Transkriptionsfaktor [<i>C. roseus</i>] AAK14790
Eca 26F07	48	Transkriptionsfaktor bZIP78 [<i>Glycine max</i>] ABI34653
	43	G-Box-bindendes Protein TAF-2 [<i>N. tabacum</i>] CAA88492

3.2 Genexpressionsanalysen in elicitierten Suspensionskulturzellen

3.2.1 Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Macroarrays

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die verwendeten cDNA-Arrays werden im Folgenden als Array Eca 01 und Eca 02

bezeichnet. Der Array Eca 01 umfasste 1108 nicht-redundante cDNAs aus der in dieser Arbeit erstellten cDNA-Bibliothek. Der Array Eca 02 beinhaltet zusätzlich zu den 1108 cDNAs weitere 290 cDNAs aus dem *Floral Genome Project* (FGP), die allerdings teilweise redundant vorlagen, und damit in der Summe 1398 cDNAs. Auf beiden Arrays wurden jeweils vier Replikate von jeder cDNA aufgebracht, so dass sich auf dem Array Eca 01 insgesamt 4432 *Spots* (Punkte) und auf dem Array Eca 02 insgesamt 5592 *Spots* pro Membran befanden. In den beiden Experimenten wurde die Genexpression in Zeitkinetiken nach Zugabe von 100 μ M Methyljasmonat (MeJA) bzw. 5 μ g/ml Hefeelicitor zu den Suspensionszellkulturen analysiert. Als Kontrolle wurde Ethanol (0,1 % v/v Endkonzentration in der Kultur), der als Lösungsmittel für das Methyljasmonat diente, verwendet. Nach der Zugabe der Substanzen wurde nach definierten Zeitpunkten jeweils 10 ml der Kultur (3-5 g Frischgewicht) steril entnommen. Nach Isolation der Gesamt-RNA und reverser Transkription wurde die cDNA radioaktiv markiert und mit den Macroarray-Membranen hybridisiert. Die **Abbildung 3.3** zeigt als Beispiel das Bild einer Macroarray-Membran nach der Hybridisierung. Durch Einlesen der Phosphorimagedaten in das Programm AIDA Image Analyzer erfolgte die Bestimmung der Strahlungsintensität für jeden Punkt auf der Membran. Um die Arraydaten einer Versuchsreihe miteinander zu vergleichen, wurden diese Werte zur Medianzentrierung in das Programm Origin importiert. Es wurde dabei mit dem Median gerechnet, weil diese Berechnung im Gegensatz zur Mittelwertberechnung weniger empfindlich gegenüber einzelnen Ausreißern einer Datenreihe ist. Um Tendenzen in der Genexpression und cDNAs mit ähnlichen Expressionsverhalten entdecken zu können, wurde eine sogenannte Clusteranalyse mit Hilfe des Programms Cluster 3.0 (Eisen *et al.*, 1998; de Hoon *et al.*, 2004) durchgeführt, bei der durch Abstandsmessung zwischen den einzelnen Expressionsprofilen der cDNAs die Daten so organisiert werden, dass Gruppen mit ähnlichen Expressionsprofilen entstehen. Die Visualisierung erfolgte mit dem Programm Java TreeView (Saldanha *et al.*, 2004), das die bei einer hierarchischen Clusteranalyse berechneten Abstände in Form eines Dendrogramms darstellt. Die Kolorierung der Expressionswerte größer als der Median erfolgte in Rotabstufungen, während für Expressionswerte kleiner als der Median Grünabstufungen verwendet wurden (siehe Abb. 3.4 b). Hierbei ist zu beachten, dass es sich in der Darstellung um Werte im Logarithmus zur Basis 2 handelt. Der Vorteil bei der Verwendung der logarithmischen Werte ist, dass diese, im Gegensatz zu normalen Verhältniswerten, normalverteilt sind. Ein Beispiel soll dies verdeutlichen: Wenn man nach Verhältnissen in der Genexpression größer als zweifach oder kleiner als einhalbfach sucht, so

ist der dyadische Logarithmus von 2 und 0,5 gleich 1 bzw. -1 , und deren Mittel ist 0. Der Mittelwert von 2 und 0,5 dagegen ist gleich 1,25.

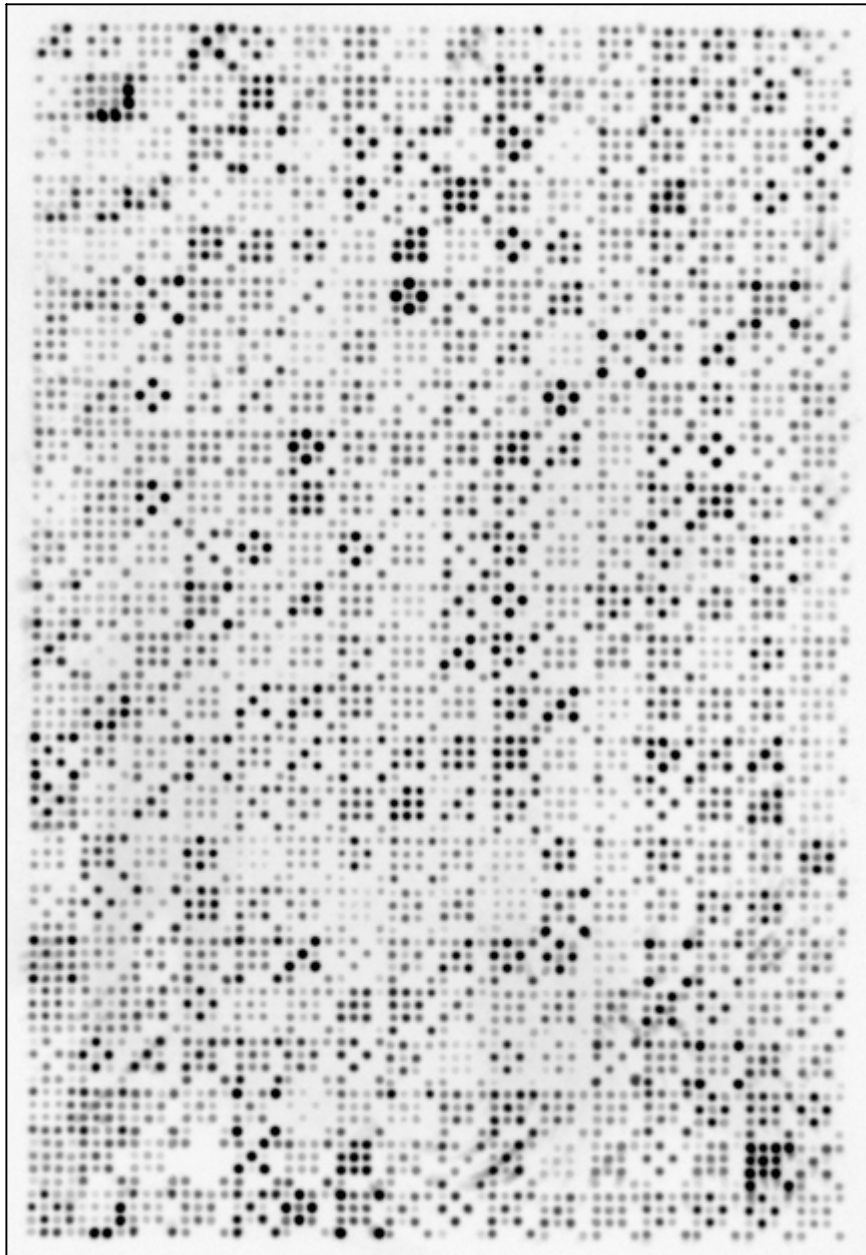


Abb. 3.3: Beispiel einer Macroarray-Membran (Array Eca 01) nach Hybridisierung (mit cDNA aus Zellen 12 h nach Elicitierung mit $5\mu\text{g/ml}$ Hefeelictor). Es sind deutlich die vier Replikate jeder cDNA auf der Membran zu erkennen.

Für die Clusteranalyse wurde ein hierarchisches Verfahren gewählt. Als Ähnlichkeitsmatrix wurde der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient verwendet. Dieser ist ähnlich dem Pearsonschen Korrelationskoeffizienten, verwendet aber Rangmaßzahlen und ist damit weniger anfällig gegenüber Abweichungen. Außerdem wird durch dieses Verfahren mehr der

Trend der Expression berücksichtigt und nicht die absoluten Werte. Als Kopplungsmethode wurde das *Complete-Linkage*-Verfahren gewählt, welches den Abstand zweier Cluster durch den Abstand des entferntesten Nachbarn bestimmt.

Aus Platzgründen ist es nicht möglich die Abbildung einer gesamten Clusteranalyse auf einer Seite darzustellen. Deshalb werden in den folgenden Abbildungen jeweils Ausschnitte gezeigt, in denen sich unter anderem auch die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen cDNAs mit Homologie zu Genen der Benzylisochinolinalkaloid-Biosynthese und Transkriptionsfaktoren befinden.

Die **Abbildung 3.4 a** zeigt einen Cluster von cDNAs, deren Expression besonders durch die Zugabe von MeJA induziert wird. Es ist auffällig, dass bereits acht Stunden nach Elicitierung mit MeJA die Transkriptmengen der cDNAs stark akkumuliert haben und bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes erhöht bleiben. Der Hefeelicitor bewirkt bei den meisten cDNAs dieses Clusters ebenfalls eine Induktion der Genexpression. Diese fällt jedoch insgesamt etwas schwächer aus. Dafür beginnt diese aber bei den cDNAs in der unteren Hälfte der Abbildung schon vier Stunden nach Elicitorzugabe.

In dem, in Abbildung 3.4 a wiedergegebenen Cluster, befinden sich zahlreiche cDNAs von Enzymen der Alkaloidbiosynthese. Besonders zu beachten sind die cDNAs des Berberinbrückenenzym (bbe1) und der *N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (cyp80b1), die als direkte Nachbarn in der Clusteranalyse ein sehr ähnliches Expressionsverhalten zeigen. Ebenfalls in diesem Cluster befinden sich die cDNAs der Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (17E05 und 17E05b), einer putativen Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (29C03), einer Tyrosin/DOPA-Decarboxylase (29E12), drei cDNAs mit Homologie zum Methylendioxybrückenenzym CYP719A1 aus *C. japonica* (29A04, 29E11 und 29F06), zwei cDNAs mit Homologie zu Cytochrom-P450-Enzymen der CYP80/82 Familien (30D03, 31C08), ein putatives Cytochrom-P450-Enzym (31B04) und einer *S*-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase (07E08). Weitere cDNAs mit Homologie zu Enzymen des Sekundärstoffwechsels in dieser Gruppierung sind die Tyrosin-*N*-Monooxygenasen CYP79A1 und CYP79A2 (28E11, 29A09 und 31B10), die Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) CYP75B2 (29G09, 30A05), und die *p*-Coumaryl-Shikimat-3'-Hydroxylase (CS3'H) CYP98A2. Eine cDNA (31D09), dessen Translationsprodukt Homologie zur Chorismat-Synthase (Tyrosinbiosynthese) zeigt, befindet sich ebenfalls in diesem Cluster. Die stark durch MeJA induzierten Transkripte 05H10 und 05H08 gehören zu einer möglichen Oxidoreduktase und einer Aldo-/Keto-Reduktase. Die cDNA 06E11 codiert für eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), dessen Transkript ebenfalls leicht durch MeJA und den Hefeelicitor induzierbar ist. Hauptsächlich

durch MeJA in der Transkription aktiviert werden die Gene einer PCPK1 (*phloem calmodulin-like-domain protein kinase*, 01G12) und eines unbekanntes Proteins (01D04).

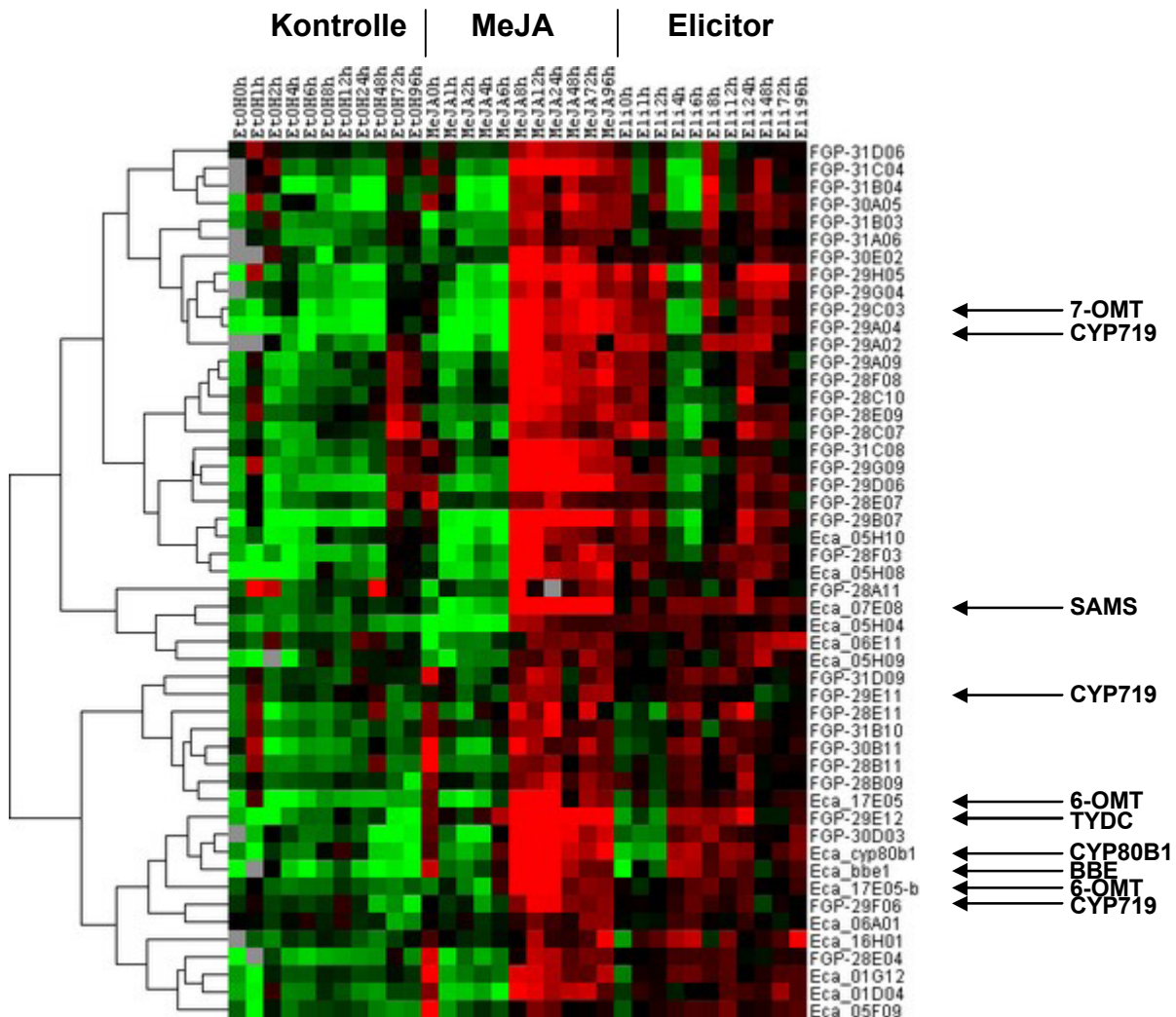


Abb. 3.4 a: Ausschnitt aus der hierarchischen Clusteranalyse (Array Eca 02). Der dargestellte Cluster enthält cDNAs mit deutlich induzierter Expression nach Elicitierung der Suspensionszellkultur mit 100µM MeJA oder 5µg/ml Hefeelicitor. Die cDNAs für das Berberinbrückenenzym (BBE), die (*S*)-*N*-Methylcochlorin-3'-Hydroxylase (CYP80B1), die Norcochlorin-6-*O*-Methyltransferase (6-OMT), die putative Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7-OMT), die Tyrosin/DOPA-Decarboxylase (TYDC), das Methylendioxybrückenenzym (CYP719) und die *S*-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase (SAMS) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Oben in der Abbildung sind die Macroarrayfilter mit den verschiedenen Elicitierungsmethoden und dem jeweiligen Zeitpunkt der Zeitkinetik bezeichnet. An der rechten Seite der Abbildung sind die cDNAs mit ihrer Identifikationsnummer bezeichnet. Das Dendrogramm links in den Abbildungen zeigt die Ähnlichkeit der Expressionsprofile. Die Rotfärbung zeigt eine erhöhte Genexpression gegenüber dem Median an, die Grünfärbung dagegen ein erniedrigte Expression. Schwarz entspricht dem Median und graue Kästchen stehen für nicht vorhandene Werte. Diese entstehen, wenn das Hybridisierungssignal schwächer als der Hintergrund war. Die Abstufung der Farbcodierung ist der Abbildung 3.4 b zu entnehmen.



Abb. 3.4 b: Farbcodierung der relativen Expressionswerte als Logarithmus zur Basis 2. Die Rotfärbung steht für eine Genexpression größer und die Grünfärbung für eine Genexpression kleiner als der Median (schwarz).

Ein weiterer Ausschnitt der Clusteranalyse ist in der **Abbildung 3.5** dargestellt. Die Expression der cDNAs in diesem Cluster wird stark durch Applikation von MeJA und teilweise durch Zugabe des Hefeelicitors induziert. Besonders 4'-OMT-homologen cDNAs zeigen eine starke Transkriptakkumulation, beginnend sechs Stunden nach MeJA-Zugabe bis zum Ende des Versuchszeitraumes. Der Hefeelicitor bewirkt eine etwas schwächere Induktion entsprechender cDNAs im Zeitraum von sechs bis vierundzwanzig Stunden nach Elicitierung. Der dargestellte Cluster beinhaltet die cDNA der 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (05F07b) und viele weitere zu ihr sehr homologe cDNAs aus dem FGP. Die endgültige Anzahl der 4'-OMT-Isoformen in *E. californica* wurde nicht ermittelt, da EST-Sequenzen generell Fehler aufweisen können und bei der Herstellung der cDNA-Bibliotheken aus Suspensionszellkulturen und jungen Blütenknospen verschiedene Varietäten verwendet wurden. Weitere cDNAs in dieser Gruppierung sind die zwei cDNAs der vermutlichen Coclaurin-*N*-Methyltransferase (21G08 und 24B04), die einer weiteren putativen Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (30D11), und sehr viele cDNAs mit Homologie zum Methylendioxybrückenenzym CYP719A1 aus *C. japonica* (02E03 (=CYP719A5) und viele weitere aus dem FGP). Die zweite cDNA (13F06 = CYP719A2) aus dem in dieser Arbeit durchgeführten EST-Projekt, die Homologie zu CYP719A1 zeigt, wird ebenfalls durch MeJA und Hefeelicitor in ihrer Expression induziert, gruppiert aber nicht in den abgebildeten Ausschnitten der Clusteranalyse. Die cDNAs der Chorismat-Mutase (CM; 31E02) und der Arogenat-Dehydrogenase (ADH; 31D10), die an der Biosynthese von Tyrosin beteiligt sind, befinden sich ebenfalls in dem in **Abbildung 3.5** gezeigten Cluster. Weitere Enzyme des Sekundärstoffwechsels werden durch die cDNAs der Cinnamat-4-Hydroxylase (C4H) CYP73 (30C10) und einer UDP-Glucose-Glucosyltransferase (05A01) in diesem Cluster repräsentiert.

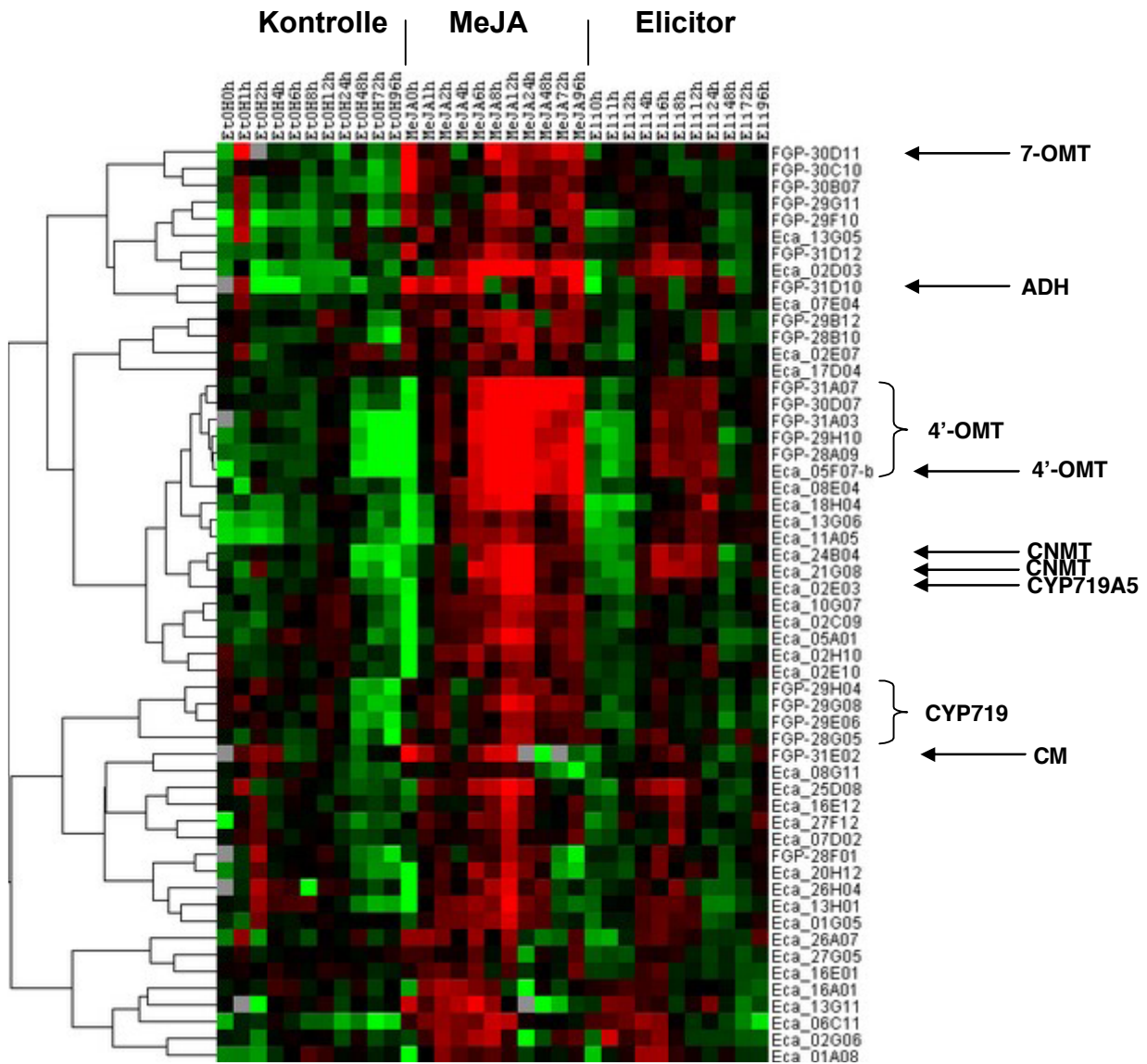


Abb. 3.5: Ausschnitt aus der hierarchischen Clusteranalyse (Array Eca 02). Der dargestellte Cluster enthält cDNAs mit deutlich induzierter Expression nach Elicitierung der Suspensionszellkultur mit $100\mu\text{M}$ MeJA oder $5\mu\text{g/ml}$ Hefeelicitor. Die cDNAs für die 3'-Hydroxy-*N*-methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (4'-OMT), die Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT), die putative Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7-OMT), das Methylendioxybrückenenzym (CYP719), der Chorismat-Mutase (CM) und die Arogenat-Dehydrogenase (ADH) sind durch Pfeile oder Klammern gekennzeichnet.

Der Cluster in **Abbildung 3.6** zeigt cDNAs mit einem zu den vorhergehenden Gruppierungen grundsätzlich verschiedenen Expressionsprofil. Die Expression dieser cDNAs erfolgt sehr schnell nach Zugabe von MeJA oder des Hefeelicitors. Der Hefeelicitor bewirkt generell eine stärkere und länger andauernde Genexpression. Die Expressionsprofile, der durch MeJA induzierten Transkripte, zeigen einen biphasischen Verlauf mit Maxima nach zwei und sechs Stunden bzw. nach vier und acht Stunden.

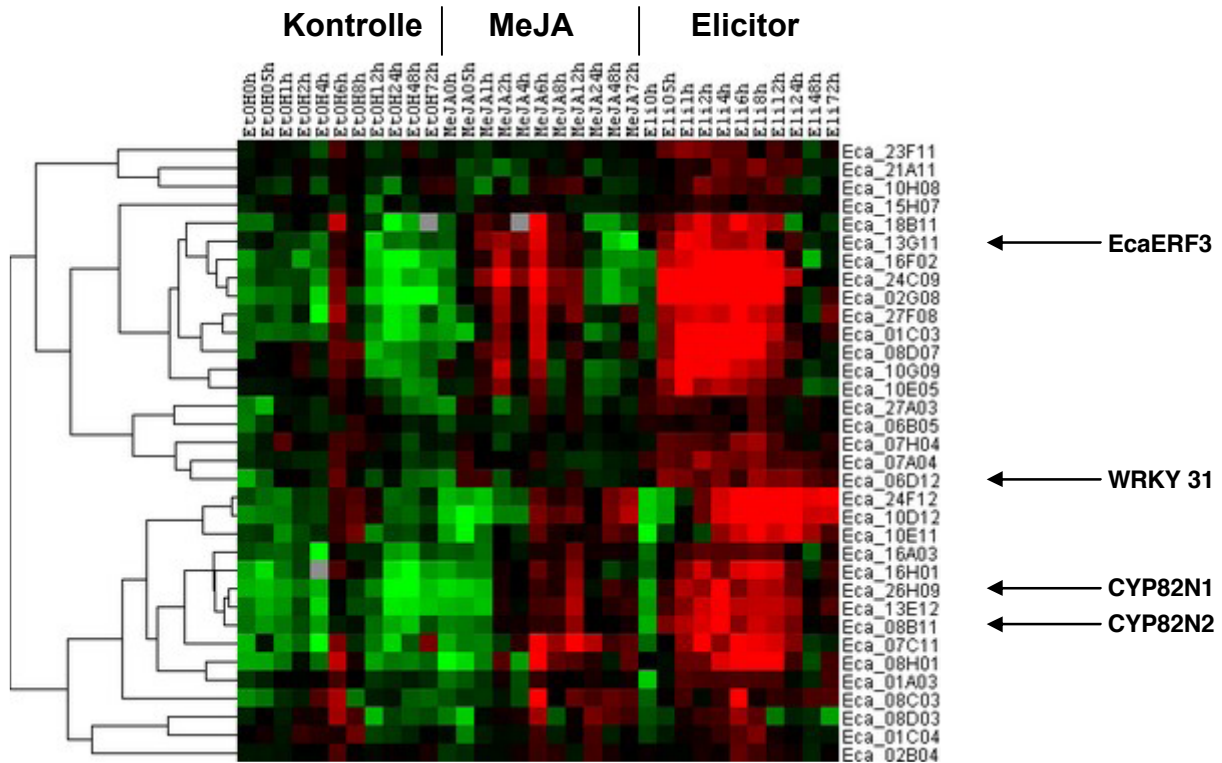


Abb. 3.6: Ausschnitt aus der hierarchischen Clusteranalyse (Array Eca 01). Der dargestellte Cluster enthält cDNAs von Genen, deren Expression bereits kurz nach Elicitierung induziert wird. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die cDNAs der Transkriptionsfaktoren EcaERF3 (13G11) und WRKY 31 (06D12) und der Cytochrom-P450-Enzyme CYP82N1 (26H09) und CYP82N2 (08B11).

Das Transkript des Transkriptionsfaktors EcaERF3 (13G11) ist bereits eine Stunde nach Applikation von MeJA und eine halbe Stunde nach Elicitierung mit dem Hefeelicitor deutlich induziert. Die gegenüber dem Median erhöhte Expression dauert bis sechs Stunden nach MeJA-Zugabe und hält bis acht Stunden nach Hefeelicitorzugabe an. In der mit Ethanol behandelten Kontrollkultur ist das Expressionsniveau von EcaERF3 oft niedriger als der Median. Insbesondere nach 12 Stunden Kulturdauer ist eine relative Repression der Genexpression zu beobachten. In diesem Cluster befindet sich ebenfalls die cDNA für den Transkriptionsfaktor WRKY 31 (06D12), dessen Transkript eine leicht erhöhte Expression 0,5 bis 24 Stunden nach Hefeelicitorzugabe, jedoch nicht nach Elicitierung mit MeJA, zeigt. Die Genexpression der beiden Cytochrom-P450-Enzyme CYP82N1 (26H09) und CYP82N2 (08B11) ist über den Zeitraum 0,5 bis 12 Stunden nach Hefeelicitorzugabe stark induziert. Dagegen ist bei MeJA-Applikation die stärkste Transkriptakkumulation von CYP82N1 und CYP82N2 nur punktuell nach 12 Stunden Kulturdauer zu beobachten.

In dem in Abbildung 3.6 dargestellten Cluster befinden sich auch mehrere stark induzierte cDNAs mit Homologie zu FAD-abhängigen Oxidoreduktasen (02G08, 24C09) und zu Tetrahydrocannabinolsäure-Synthasen (10D12, 10E11 und 24F12). Die Tetrahydrocannabinolsäure-Synthase zeigt ihrerseits Homologie zum Berberinbrückenenzym (Sirikantaramas *et al.*, 2004). Weitere cDNAs in diesem Cluster zeigen Homologie zu einer durch Verwundung induzierten MAP-Kinase (10G09) und verschiedenen Rezeptor-ähnlichen Protein-Kinasen (01C04, 08D07, 08H01). Die cDNA 16H01 zeigt Homologie zu der Rezeptor-ähnlichen Kinase *CHRK1* aus *N. tabacum*, die eine ungewöhnliche Chitinase-ähnliche Sequenz in der extrazellulären Domäne besitzt (Kim *et al.*, 2000). Suppression der *CHRK1* Expression führt zur Bildung von Kallusgewebe, aus dem durch subtraktive PCR der AP2/ERF-Transkriptionsfaktor NtCEF1 identifiziert wurde (Lee *et al.*, 2005).

Die **Abbildung 3.7** zeigt ebenfalls eine Gruppierung mit sehr schnell nach Elicitierung induzierten cDNAs. Das Transkript von EcaERF3 (18F08) ist nur kurzzeitig 0,5 Stunden bis 1 Stunde nach Zugabe des Hefeelicitors induziert. MeJA bewirkt eine länger andauernde Induktion der Expression von EcaERF3 von 0,5 Stunden bis 12 Stunden nach Zugabe zur Suspensionszellkultur. In den Kontrollen ist die Expression von EcaERF3 eher reprimiert und teilweise sind die Signalintensitäten geringer als der Hintergrund.

Weitere induzierte cDNAs in diesem Cluster zeigen Homologie zu einem β -1,3-Glucanase-ähnlichen Protein (26A04), einer Xyloglucan-endo-1,4- β -D-Glucanase (18D09), einer möglichen Rezeptorprotein-Kinase (07F02), einem putativen RING-Zinkfinger-Protein (07E12), einem NAM/CUC2-ähnlichen Protein (25C09), dem „Schock-Protein“ (24H07), einer Diphenol-Oxidase (06F04), einem Hexose-Transporter (06G01) und einem ABC-Transporter (26A07). Für andere induzierte Transkripte befinden sich in den Datenbanken keine homologen Sequenzen (02G06) bzw. nur Proteine unbekannter Funktion (02G07, 20A01, 27C07, 27C08).

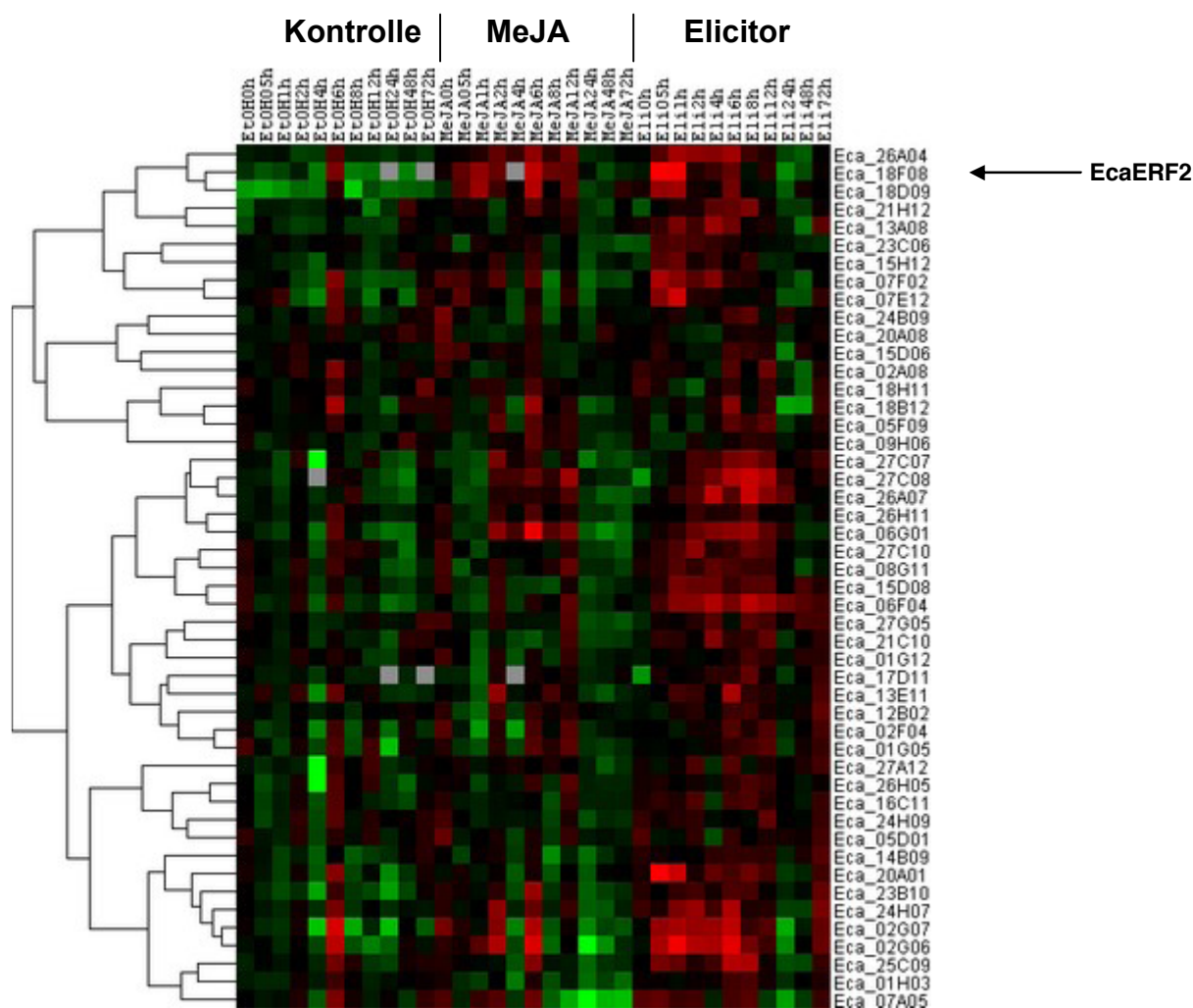


Abb. 3.7: Ausschnitt aus der hierarchischen Clusteranalyse (Array Eca 01). Der Cluster enthält cDNAs mit schnell nach Elicitorung induzierter Expression. Mit einem Pfeil gekennzeichnet ist die cDNA des Transkriptionsfaktors EcaERF2 (18F08).

3.2.2 Genexpressionsanalysen mittels Northern Blot

Zur Überprüfung der mit den cDNA-Macroarrays erhaltenen Expressionsprofile wurde die Genexpression ausgewählter cDNAs, die für in der Alkaloidbiosynthese beteiligte Enzyme codieren oder Homologie zu cDNAs aus anderen Spezies zeigen, mittels Northern Blots untersucht. Diese Experimente wurden im Wesentlichen von Nadja Grobe im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Grobe, 2005). Die **Abbildung 3.8** zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse. Es ist deutlich die koordinative Genexpression der biosynthetischen Gene zu erkennen. Die Akkumulation der Transkripte ist in der **Abbildung 3.8** durch zwei rote Rahmen hervorgehoben. Sie beginnt circa sechs Stunden nach Zugabe von MeJA zu den Zellen, während nach Zugabe des Hefeelicitors schon nach vier Stunden erhöhte

Transkriptmengen zu erkennen sind. Diese Induktion der Genexpression ist teilweise transient, während sie sich für einige der cDNAs auch über den gesamten Untersuchungszeitraum erstreckt. Die Expression des Berberinbrückenzym (BBE) und der (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (CYP80B1) sind nach Zugabe von MeJA stark induziert.

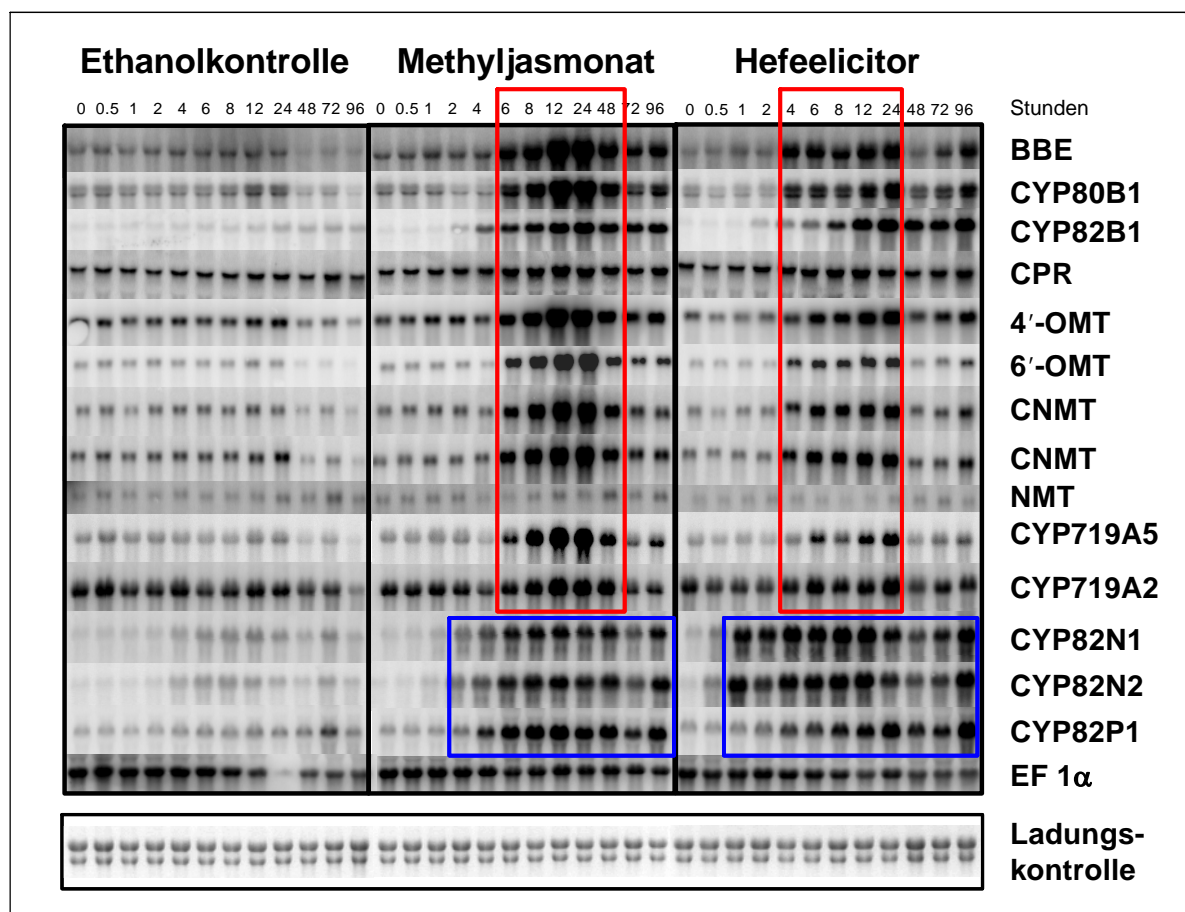


Abb. 3.8: Northern Blots von ausgewählten cDNAs mit Homologie zu biosynthetischen Enzymen der Benzylisochinolinalkaloidsynthese. Durch einen roten und einen blauen Kasten sind cDNAs mit ähnlichem Expressionsprofil gekennzeichnet. Als Kontrolle wurde der Northern Blot mit dem Elongationsfaktor 1a (EF 1a) hybridisiert. Unten ist das mit Ethidiumbromid angefärbte Agarosegel zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung mit RNA dargestellt.

Der Hefeelicitor bewirkt eine etwas weniger starke Induktion. Die Transkriptmengen nehmen 48 Stunden nach Zugabe von MeJA, bzw. 24 Stunden nach Zugabe des Hefeelicitors wieder ab, bleiben jedoch in beiden Fällen gegenüber dem Zustand vor der Elicitierung erhöht. Die Transkripte der Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6-OMT), der Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT), der 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (4'-OMT) und der beiden Cytochrom-P450-Enzyme CYP719A2 und CYP719A5 akkumulieren mit einer ähnlichen Kinetik erreichen aber 24 Stunden nach der Elicitierung wieder nahezu ihren

Grundzustand. Die Induktion von CYP719A5 ist auch deutlicher als die von CYP719A2, dessen Transkript eine relativ hohe basale Expression zeigt.

Die Transkripte der Cytochrom-P450-Enzyme CYP82N1, CYP82N2 und CYP82P1 zeigen eine grundsätzlich andere Kinetik der Transkription. Die Akkumulation der Transkripte (in der Abb. 3.8 durch zwei blaue Rahmen hervorgehoben) beginnt viel früher, nämlich schon zwei Stunden nach Zugabe des MeJA, bzw. eine Stunde nach Hefeelicitorzugabe und sie dauert in beiden Fällen bis 96 Stunden nach Elicitierung an. CYP80B1 und CYP82B1 besitzen sehr ähnliche Expressionsprofile, jedoch ist die basale Expression von CYP80B1 höher als die von CYP82B1, die im Grundzustand kaum zu detektieren ist. Die Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) zeigt bereits im Basalzustand eine deutlich detektierbare Genexpression, die durch die Elicitierung steigern lässt. Die Induktion ist jedoch nicht so stark wie bei den anderen biosynthetischen Genen. Als Kontrolle wurde, zusätzlich zur Ladungskontrolle, die cDNA des Elongationsfaktors 1 α (EF 1 α) zur Hybridisierung des Northern Blots verwendet. Dieser zeigt eine konstitutive Expression und seine Transkription ist nicht durch MeJA oder den Hefeelicitor induzierbar.

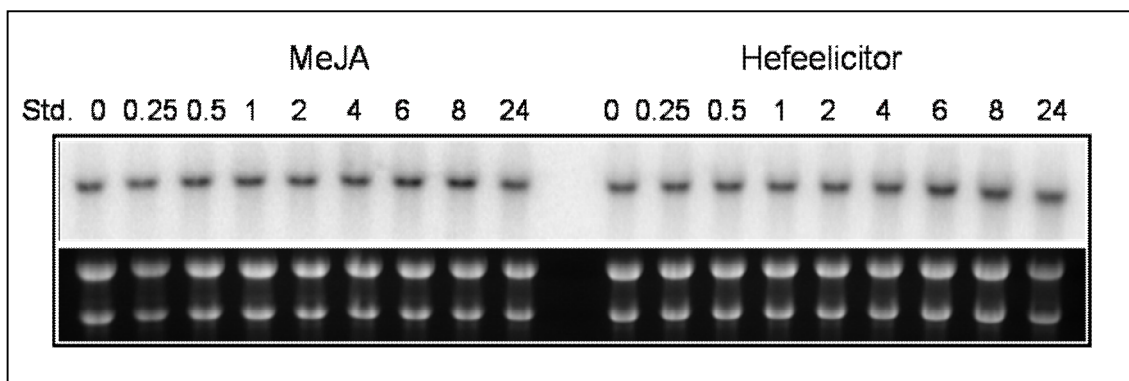


Abb. 3.9: Northern Blot des Transkriptionsfaktors EcaERF1 (08G07). Die linke Hälfte zeigt die Expression nach MeJA-Applikation, die rechte Hälfte nach Elicitierung mit dem Hefeelicitor. Die Anfärbung mit Ethidiumbromid im unteren Teil der Abbildung zeigt die gleichmäßige Beladung des Gels mit RNA.

Die **Abbildung 3.9** zeigt einen Northern Blot des Transkriptionsfaktors EcaERF1, dessen Genexpression in den Macroarray-Expressionsanalysen nicht durch Zugabe von MeJA oder Hefeelicitor induzierbar war. Auch im Northern Blot ist eine konstitutive Expression des Transkriptionsfaktors EcaERF1 zu erkennen. Die Transkription ist weder durch MeJA-Behandlung noch durch Elicitierung der Zellen induzierbar. Die Anfärbung mit Ethidiumbromid im unteren Teil der Abbildung zeigt die gleichmäßige Beladung des Gels mit RNA.

Insgesamt zeigt sich, dass die mittels Northern Blot und cDNA-Macroarray unabhängig voneinander erhaltenen Expressionsprofile sehr gut miteinander vergleichbar sind und dieselbe Tendenz zeigen.

3.3 Isolation und *in silico*-Analyse des Promotorbereiches von Genen der Alkaloidbiosynthese

Die Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Macroarrays und Northern Blots hatten gezeigt, dass die Transkripte vieler an der Alkaloidbiosynthese beteiligten Enzyme induzierbar sind. Der Grund für diese transkriptionelle Aktivierung der Genexpression sollte sich auf das Vorhandensein spezieller *cis*-regulatorischer Elemente im Promotorbereich dieser Gene zurückführen lassen. Deshalb wurden die Promotorbereiche des Berberinbrückenenzym, der 3'-Hydroxy-*N*-Methylcocclaurin-4'-*O*-Methyltransferase und der Norcocclaurin-6-*O*-Methyltransferase isoliert und auf bekannte *cis*-Elemente untersucht. Die Isolation der Promotorbereiche erfolgte durch Verwendung des GenomeWalker™ Universal Kits (BD Biosciences) und geeigneten sequenzspezifischer Oligonukleotidprimern (siehe Tab. 7.1). Die größten Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert und mittels Vektorprimern (M13 forward und M13 reverse) und von der erhaltenen Sequenz abgeleiteten, sequenzspezifischen Primern sequenziert. Die Identifizierung der *cis*-regulatorischen Elemente erfolgte online mit Hilfe der Software Signal Scan (Prestridge, 1991) und der Datenbank PLACE (Higo *et al.*, 1999, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

3.3.1 Isolation des Promotorbereiches des Berberinbrückenenzym

Für das Berberinbrückenenzym (BBE) konnte ein 1958 bp großer Bereich der stromaufwärts des Translationstartpunktes gelegenen genomischen DNA aus der *EcoRV*-Library isoliert werden. Die Nukleotidsequenz stimmt mit der in der Dissertation von K. Hauschild bestimmten Sequenz überein (Hauschild, 1995) und verlängert diese stromaufwärts um 427 Basenpaare. Als Transkriptionsstartpunkt wurde von K. Hauschild mittels *Primer Extension*-Analyse ein Desoxythimidin 65 bp vor dem Translationsstartpunkt bestimmt und wird hier für die Bezeichnung der Nukleotidpositionen übernommen. Somit verbleiben von der gesamten Nukleotidsequenz 1893 bp vor dem Transkriptionsstart.

Die Untersuchung des Promotorbereichs auf mögliche *cis*-regulatorische Elemente ergab eine große Anzahl an bekannten DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, von denen hier

nur auf einige, die im Zusammenhang mit der Stress-induzierten Genexpression stehen, näher eingegangen werden soll.

Insgesamt wurden dreizehn W-Boxen mit dem Sequenzmotiv (T)(T)TGAC(C/T) in der Promotorregion des BBE gefunden. Sie sind in der **Abbildung 3.10** mit W1 bis W13 rückwärts vom Translationsbeginn ausgehend gekennzeichnet. W-Boxen befinden sich in vielen Promotoren von durch Stress, Pathogene und Salicylsäure (SA) induzierbaren Genen und sind als Bindungsstellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren bekannt (de Pater *et al.*, 1996; Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999). An den Positionen -83 bis -76 und -579 bis -573 wurden zwei G-Boxen und an der Position -549 bis -544 eine T-Box identifiziert. Sie besitzen die palindrome Kernsequenz CACGTG bzw. AACGTT und sind Bindungsmotive für ACGT-Element-bindene bZIP-Transkriptionsfaktoren (Foster *et al.*, 1994). Zwischen der W-Box (W5) und der ersten G-Box wurde eine GCC-Box (AGCCGCC) an der Position -108 bis -101 identifiziert. Sie ist ein *cis*-Element für EREBP/ERF-Transkriptionsfaktoren (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). Die GCC-Box ist sehr häufig in den Promotoren Stress- und Ethylen-regulierter Gene zu finden (Sessa *et al.*, 1995; Shinshi *et al.*, 1995; Lehman *et al.*, 1996). Weiter stromaufwärts liegt an der Position -1585 bis -1580 ein Sequenzmotiv (ACCGAC), das die Kernsequenz der CRT (*C-repeat*)- und DRE (*dehydration-responsive element*)- Elemente enthält (Baker *et al.*, 1994; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). Diese *cis*-Elemente sind Bindungsstellen für DREB (*DRE-binding proteins*)- und CBF (*C-repeat binding factor*)- Transkriptionsfaktoren (Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Außerdem wurden drei RAV1A-Elemente mit der Sequenz CAACA gefunden. Das RAV1A-Element stellt das Bindungsmotiv der AP2/ERF-DNA-Bindungsdomäne von RAV1 dar (Kagaya *et al.*, 1999). Jedoch konnte kein RAV1B-Element (CACCTG) als Bindungsstelle für die B3-Bindungsdomäne von RAV1 in der Promotorregion des BBE identifiziert werden. Des Weiteren wurden acht mögliche *cis*-Elemente für MYB-Transkriptionsfaktoren gefunden, die vier verschiedene Bindungsmotive beinhalten (3× MYB-Core (CNGTTA/G), 3× AtMYB1 (A/TAACCA), 1× MYB2cons. (C/TAACG/TG) und 1× MYB1LePR (GTTAGTT)). Vier E-Box Motive (CANNTG), die auch als MYC-Cons. oder RRE (*R response element*) bezeichnet werden (Hartmann *et al.*, 2005) wurden ebenfalls identifiziert. In der untersuchten Promotorregion befinden sich auch drei GT-1 Elemente (GAAAAA oder GRWAAW). Diese kommen in vielen Licht-regulierten Genen (z. B. RBCS) vor, werden aber auch mit der Pathogen-induzierten Genexpression in Verbindung gebracht (Buchel *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2004). Schließlich wurden nahe dem Transkriptionsstartpunkt auch eine putative TATA-Box (TATAAAT) und eine CAAT-Box (CAAT) gefunden.

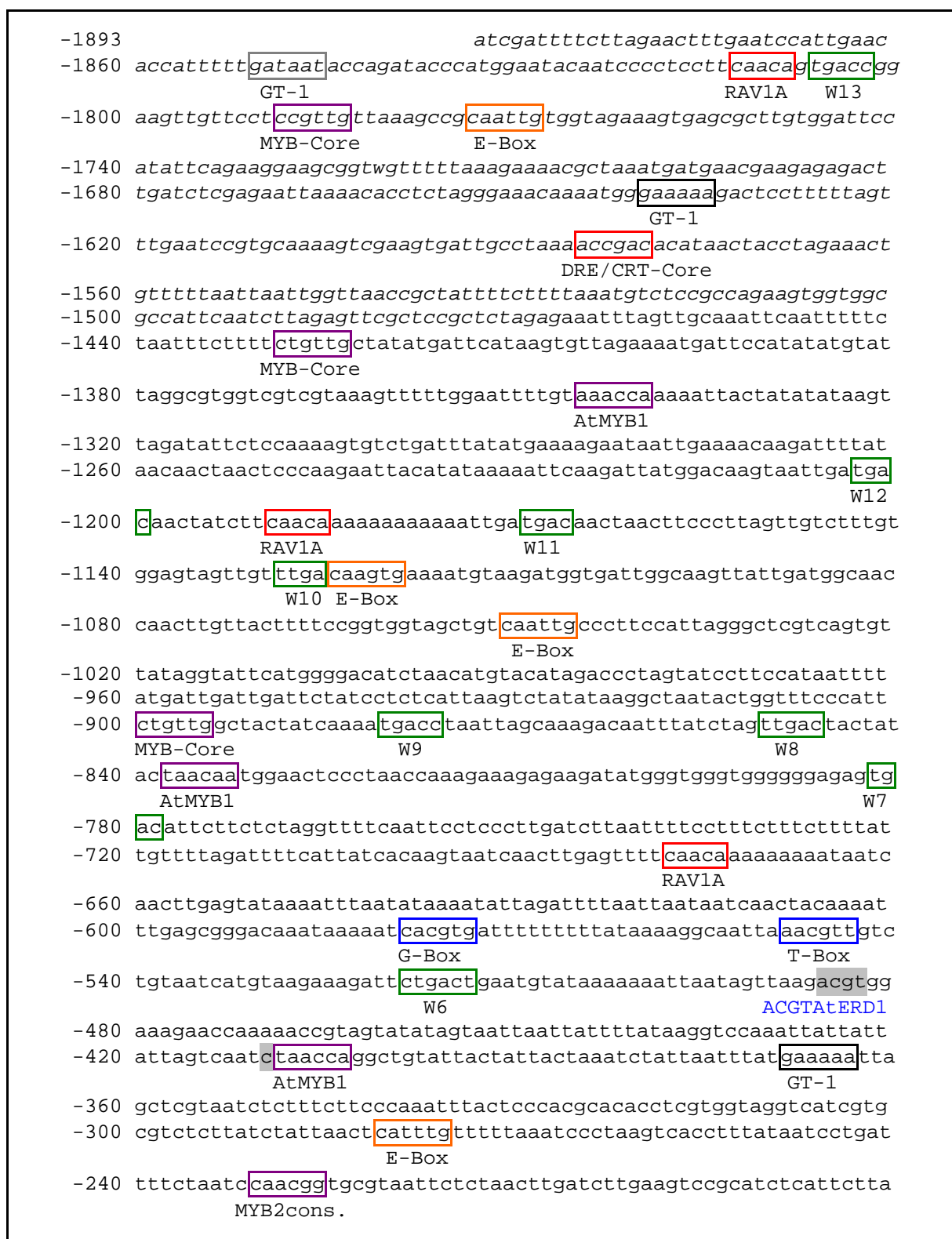


Abb. 3.10: Nukleotidsequenz des Berberinbrückenenzym-Promotorfragmentes.
(Fortsetzung auf nächster Seite)



Abb. 3.10: Nukleotidsequenz des Berberinbrückenenzym-Promotorfragmentes. Der in dieser Arbeit neu beschriebene Bereich ist kursiv gedruckt. Der Anfang des codierenden Bereiches ist in die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code übersetzt. Der Transkriptionsstartpunkt (nach Hauschild, 1995) ist mit +1 gekennzeichnet. Das Startcodon ist durch Fettdruck hervorgehoben. Putative Boxen wie TATA- und CAAT-Box sind schwarz eingerahmt. Einige putative *cis*-regulatorische Elemente sind durch farbige Kästchen markiert: **GCC-Box**, **DRE/CRT**, **RAV1A**, **W-Box**, **G-Box**, **T-Box**, **E-Box**, **MYB**, **GT-1**. Die Oligonukleotidsequenz, die für die Bindungsexperimente verwendet wurde, ist grau hinterlegt.

3.3.2 Isolation des Promotorbereiches der 3'-Hydroxy-N-Methylcoclaurin-4'-O-Methyltransferase

Für die 3'-Hydroxy-N-Methylcoclaurin-4'-O-Methyltransferase (4'-OMT) wurde ein 319 bp großer Bereich der stromaufwärts des Translationsstartpunktes liegenden genomischen DNA aus der *DraI*-Library isoliert und sequenziert. Die **Abbildung 3.11** zeigt die Nukleotidsequenz des Promotorbereiches der 4'-OMT. Der genaue Transkriptionsstartpunkt wurde nicht experimentell bestimmt, der Anfang der cDNA-Sequenz ist aber in der **Abbildung 3.11** gekennzeichnet. Der Bereich der isolierten genomischen DNA vor der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) der cDNA hat eine Länge von 260 bp. Die Bezeichnung der Nukleotidpositionen im Promotorbereich der 4'-OMT erfolgt relativ zum Translationsstart.

Bei der Analyse auf putative *cis*-Elemente wurde 45 bis 38 bp vor Beginn der cDNA-Sequenz eine TATA-Box (TATAAAT) gefunden. Eine CAAT-Box konnte nicht eindeutig identifiziert werden. An der Position -154 bis -148 befindet sich auf dem nicht-codierenden (*antisense*) Strang eine GCC-Box (AGCCGCC). Kurz vor dem Beginn der cDNA-Sequenz überlappen sich zwei putative *cis*-regulatorische Elemente: ein ERE (*ethylene-responsive element*) mit dem Sequenzmotiv AWTTCAAA (Montgomery *et al.*, 1993; Itzhaki *et al.*, 1994) und die

Bindungsstelle für den MYB-Transkriptionsfaktor AtMYB1 (AAACCA). Ferner befinden sich in dem untersuchten Promotorbereich eine I-Box (GATAA) und ein GT1-Element (GRWAAW), welche oft in den Promotoren von durch Licht regulierter Gene vorkommen (Donald & Cashmore, 1990; Green *et al.*, 1988; Villain *et al.*, 1996). Außerdem wurden ein RAV1A-Element (CAACA) ohne zugehörige RAV1B-Bindestelle und zwei E-Boxen identifiziert. Eine W-Box sowie eine G-Box wurden in dem untersuchten Promotorfragment der 4'-OMT nicht gefunden.

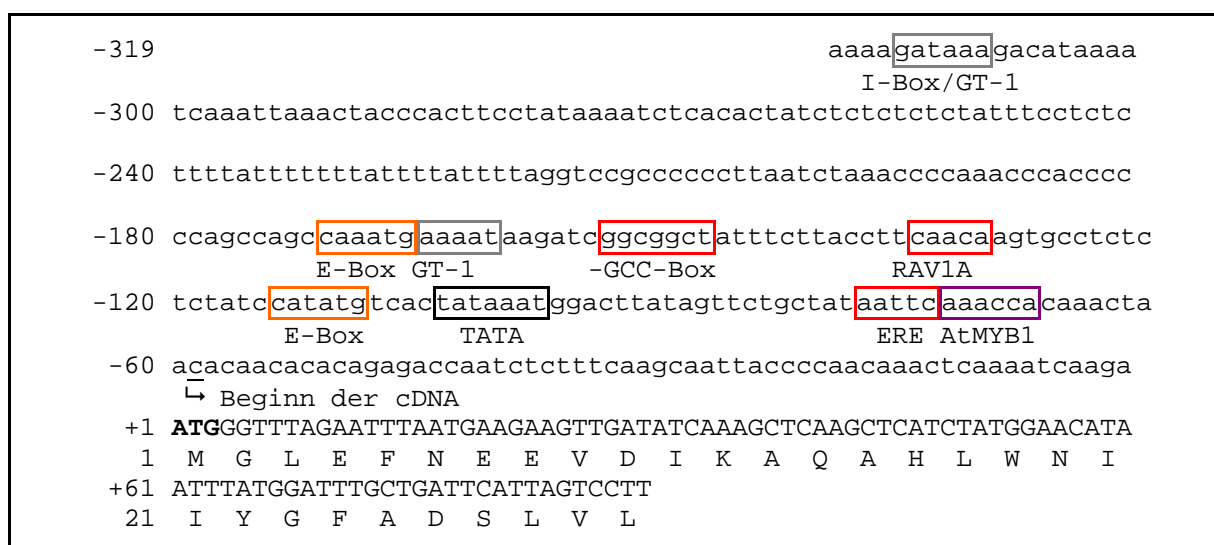


Abb. 3.11: Nukleotidsequenz des Promotorfragmentes der 3'-Hydroxy-N-Methylcoclorin-4'-O-Methyltransferase. Der Anfang des codierenden Bereiches ist in die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code übersetzt. Der Translationsstartpunkt ist mit +1 gekennzeichnet. Das Startcodon ist durch Fettdruck hervorgehoben. Der Beginn der cDNA-Sequenz ist angegeben. Putative Boxen wie TATA- und CAAT-Box sind schwarz eingerahmt. Einige putative *cis*-regulatorische Elemente sind durch farbige Kästchen markiert: GCC-Box, ERE, RAV1A, E-Box, MYB, I-Box/GT-1.

3.3.3 Isolation des Promotorbereiches der Norcoclorin-6-O-Methyltransferase

Ein 472 bp großer Bereich des Promotors der Norcoclorin-6-O-Methyltransferase (6-OMT) wurde aus der *StuI*-Library isoliert und sequenziert. Die **Abbildung 3.12** zeigt die Nukleotidsequenz des Promotorbereiches der 6-OMT. Der genaue Transkriptionsstartpunkt wurde nicht experimentell bestimmt, daher beziehen sich alle Positionsangaben auf den Translationsstartpunkt. Der Anfang der cDNA-Sequenz ist aber in der **Abbildung 3.12** markiert. Der Bereich vor der 5'-UTR der cDNA-Sequenz besitzt eine Länge von 398 Basenpaaren.

Eine TATA-Box befindet sich 82 bis 75 Nukleotide vor dem Beginn der cDNA-Sequenz. Davor liegt achtzehn Nukleotide weiter stromaufwärts eine CAAT-Box. Auf dem nicht-codierenden (*antisense*) Strang wurden drei W-Boxen ((T)TGAC(C/T)) identifiziert. An der Position -256 bis -261 befindet sich eine G-Box (CACGTG). Ein RAV1A-Element (CAACA) ohne zugehöriges RAV1B-Element wurde stromabwärts der TATA-Box gefunden. Direkt daneben und zwischen CAAT- und der putativen TATA-Box befinden sich zwei Bindungsstellen für MYB-Transkriptionsfaktoren (AtMYB1, A/TAACCA). Ferner wurden zwei GT-1 Elemente (GRWAAW) im 5'-untranslatierten Bereich der cDNA identifiziert.



Abb. 3.12: Nukleotidsequenz des Promotorfragmentes der Norcochlorin-6-O-Methyltransferase. Der Anfang des codierenden Bereiches ist in die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code übersetzt. Der Translationsstartpunkt ist mit +1 gekennzeichnet. Das Startcodon ist durch Fettdruck hervorgehoben. Der Beginn der cDNA-Sequenz ist angegeben. Putative Boxen wie TATA- und CAAT-Box sind schwarz eingerahmt. Einige putative *cis*-regulatorische Elemente sind durch Kästchen markiert: RAV1A, W-Box, G-Box, MYB, GT-1.

3.4 Funktionelle Charakterisierung des Transkriptionsfaktors EcaERF2

Anhand der Genexpressionsanalysen wurden die beiden Transkriptionsfaktoren EcaERF2 und EcaERF3 identifiziert, deren Transkripte nach Elicitierung mit MeJA und dem Hefeelicitor schnell und deutlich induzierbar sind. Für EcaERF1 wurde in Macroarray- und Northern Blot-Analysen eine konstitutive, nicht induzierbare Expression nachgewiesen. Aufgrund ihrer

Expressionsprofile und der Sequenzhomologie zu Transkriptionsfaktoren der AP2/EREBP-Familie liegt eine Beteiligung von EcaERF2 und EcaERF3 an der Regulation der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* nahe. Für weitere Vertreter dieser Transkriptionsfaktorfamilie wurde bereits die regulatorische Rolle der Terpenindolalkaloidbiosynthese in *C. roseus* nachgewiesen (Menke *et al.*, 1999 b; van der Fits & Memelink, 2000 und 2001). Deshalb sollte im Folgenden der Transkriptionsfaktor EcaERF2 hinsichtlich seiner möglichen Funktion als Regulator der Stress-induzierten Alkaloidbiosynthese näher charakterisiert werden. EcaERF3 wurde nicht weiter funktionell untersucht, da die vollständige cDNA-Sequenz nicht ermittelt werden konnte.

3.4.1 Sequenzanalyse von EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3

Die cDNAs der Transkriptionsfaktoren EcaERF1 (08G07) und EcaERF2 (18F08) lagen bereits als vollständige Klone in der cDNA-Bibliothek vor und wurden mittels sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer komplett sequenziert. Die beiden cDNA-Klone von EcaERF3 (13G10, 13G11) waren jedoch beide unvollständig. Die vollständige Sequenz der cDNA wurde versucht mittels 5'-RACE-PCR zu erhalten. Trotz dreier unabhängiger Versuche konnten der Sequenz nur dreizehn zusätzliche Nukleotide gegenüber der Sequenz aus der cDNA-Bibliothek hinzugefügt werden. Möglicherweise verhinderten starke Sekundärstrukturen der mRNA die reverse Transkription.

Die Nukleotidsequenzen von EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 sind zusammen mit ihren abgeleiteten Proteinsequenzen im Anhang (siehe Abb. 7.1-7.3) wiedergegeben.

Die cDNA von EcaERF1 hatte eine Länge von 988 bp. Der Klon zeigte trotz fehlenden Poly-A-Schwanzes einen durchgängigen offenen Leserahmen von 669 bp. Das entspricht einem Protein von 222 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 25,0 kDa. Der cDNA-Klon von EcaERF2 hatte eine Länge von 1118 bp und ein offenes Leseraster von 942 bp. Das entspricht einem Protein mit 313 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 35,2 kDa. Die partielle cDNA von EcaERF3 hatte eine Länge von 1285 bp mit einem offenen Leseraster von 1017 bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz hat eine Länge von 338 Aminosäuren und das Peptid ein berechnetes Molekulargewicht von 37,1 kDa. Auffällig ist, dass EcaERF3 ein recht großer Transkriptionsfaktor zu sein scheint. Die durchschnittliche Proteingröße von ORCA2, ORCA3 und EREBP-1 bis 4 (NtERF 1-4) beträgt zum Vergleich ca. 233 Aminosäuren (26 kDa). ORCA1 hat eine Länge von 376 AS (41 kDa). Selbst der direkte Sequenzvergleich von EcaERF3 mit RAP2.6 aus *A. thaliana* (192 AS, 22 kDa) und einem AP2/ERF-Protein aus *V. vinifera* (CAO71725; 352 AS, 38 kDa), zwei Proteine mit

großer Ähnlichkeit zu EcaERF3, lässt keine eindeutigen Schlüsse auf die Anzahl der fehlenden Aminosäuren in der Sequenz von EcaERF3 zu.

EcaERF1		<u>MCGGAI</u> I SDFI	11
EcaERF2	MATNDEASTLNLIRQHLGLDGRSLESFLNQITDSENDSSYQHKPQLNSAS		50
EcaERF3part		...TRGSGSGGGGGSYTVSS	17
EcaERF1	PTSRSRRLTAGYLWPDSSKKNAGNNRSK.....SLRSEFMNVDDDFEADFQ		56
EcaERF2	SVSDSSSKTSNSTISNSIFSNQNLKFDIEDTRNSSIFEFISKPIKNENDYS		100
EcaERF3part	<u>PSSSS</u> ...YSSSSWGGSGSGQKRVREDD....QISTDGYGGQFSDSVNFR		60
EcaERF1	EFKDDGSEDEVGVKSFSFTAAS.....AGARGSTAVKSVEYNGPAEKS		99
EcaERF2	RFEITHSNSSLSPNTSDFTFVHDRKPSLKISLPSVKKHNWTTTTTTGQTP		150
EcaERF3part	NFRG.STEEVRGAIITTTITGN.....IEAPLVDSSENTSSSNQEIIGG		102
EcaERF1	AKRRRKNQYRGIRQRPWGKWAAEIRDP.RKGVVWLGTFTNTAEAAARAYD		148
EcaERF2	IDTVKTRKYRGVQRQRPWGKFAAEIRDPNRKGSRVWLGTFTETGIEAAKAYD		200
EcaERF3part	GERRRK...YRGVQRQRPWGKWAAEIRDP.HKAARVWLGTFTDTAEAAARAYD		149
EcaERF1	AEARRIRGNKAKVNFDP...ESPPPVEQPAVKANLHN.....		182
EcaERF2	SAAFKMRGSKAILNFPL...EAGQSRPVINICRRKG.....		235
EcaERF3part	EAALRFRGNRAKLNFPENVTLRPSISVSPSTHFSISNSPSTLFSVSQNNP		199
EcaERF1	...QLPVADNPTMVKPN.....IDADHILTWMRISSTPRVSWKR.RQSI		222
EcaERF2	...KEEIEETEEIKVIKQIKR...DESPEFENKSCVKKFPATSPPLTPSNWA		279
EcaERF3part	SFIQSPLEQQQQQLQRNNSDTIINTTDYIEYTFQFLQNSESTFQFR.QQPI		248
EcaERF1	*		
EcaERF2	CIWDGMDINGVFDVPLLSPLSPHPSLGYPLTVI*		313
EcaERF3part	NQLDQMFYNPSFLPPFQSPSPITSSISSSSSSIVSPFSTFLSNQQQQQQ		298
EcaERF1			
EcaERF2			
EcaERF3part	MGSYNFRPPETQGQMGIRRSNFPAPFSPMDSGHYPPPPPPS*		338

Abb. 3.13: Sequenzhomologievergleich der Transkriptionsfaktoren EcaERF1, EcaERF2 und der partiellen Aminosäuresequenz von EcaERF3. Aminosäuren, die in zwei Sequenzen konserviert sind, sind hellgrau hinterlegt, während identische Aminosäuren in allen drei Sequenzen dunkelgrau hinterlegt sind. Die AP2/ERF-DNA-Bindungsdomäne ist durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Die Positionen 14A und 19D sind durch Sternchen markiert. Der grüne Rahmen markiert das MCGGAI(I/L)-Motiv nach Tournier *et al.* (2003). Mögliche Kernlokalisierungssignalsequenzen sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Putative Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin-Proteinkinasen [xx(S/T)Pxx] sind doppelt unterstrichen, während die möglichen Docking-Motive für MAP-Kinasen durch unterbrochene Unterstreichung markiert sind. Der Bereich von EcaERF2, der zur heterologen Expression in den Vektor pET41 kloniert wurde ist einfach unterstrichen.

Die **Abbildung 3.13** zeigt einen Sequenzhomologievergleich von EcaERF1, EcaERF2 und der partiellen Aminosäuresequenz von EcaERF3. Allen drei Sequenzen gemeinsam ist ein 57 bis 58 Aminosäuren langer Bereich von sehr konservierten Aminosäureresten. Sie bilden die

DNA-Bindungsdomäne der AP2/ERF-Familie von Transkriptionsfaktoren. Außerhalb dieses Bereiches sind die Aminosäuresequenzen sehr divergent und haben nur wenige identische Aminosäuren. Innerhalb der DNA-Bindungsdomäne sind in allen drei Transkriptionsfaktoren die Aminosäuren Alanin an Position 14 und Asparaginsäure an Position 19 konserviert. Dies ist Merkmal der ERF-Unterfamilie, während die Mitglieder der CBF/DREB-Unterfamilie an den Positionen 14 und 19 die Aminosäuren Valin und Glutaminsäure besitzen.

Direkt N-terminal der DNA-Bindungsdomäne befinden sich in den Sequenzen von EcaERF1 und EcaERF3 und etwas C-terminal der DNA-Bindungsdomäne in EcaERF2 einige Arginin- und Lysinreste. Diese Aminosäuren fungieren wahrscheinlich als basisches Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*) (Smith & Raikhel, 1999). Alle drei Proteinsequenzen besitzen N-terminal der DNA-Bindungsdomäne Bereiche mit vielen sauren Aminosäuren, die zudem auch reich an Serinresten sind. EcaERF3 zeigt auch C-terminal der AP2/ERF-Domäne Serin-reiche Abschnitte und Häufungen von sauren Aminosäuren. Diese Bereiche haben möglicherweise eine Funktion als *trans*-Aktivierungsdomäne. Serin- und Threonin-reiche Sequenzen befinden sich zudem häufiger in der transkriptionellen Aktivator-domäne (Gerber *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2005).

Mit Hilfe eines Programms zur Vorhersage von funktionellen Motiven in Proteinsequenzen (*Eukaryotic Linear Motif resource for functional Sites in Proteins*, ELM; <http://elm.eu.org/>) wurden in allen drei Transkriptionsfaktoren putative Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin-Proteinkinasen und Docking-Motive für MAP-Kinasen identifiziert. Diese könnten der posttranslationalen Regulation dienen.

EcaERF1 besitzt das konservierte, N-terminale MCGGAI(I/L)-Motiv, dessen Funktion allerdings noch nicht bekannt ist (Tournier *et al.*, 2003). Keine der drei Sequenzen enthält dagegen das C-terminale EAR- (ERF-associated amphiphilic repression) Motiv [(L/F)DLN(L/F)xP], das für eine aktive Repression der Genexpression verantwortlich ist (Ohta *et al.*, 2001).

Um etwas mehr über eine mögliche Funktion zu erfahren wurde eine phylogenetische Analyse der Proteinsequenzen (siehe **Abb. 3.14**) durchgeführt. Für den Vergleich wurden nur die DNA-Bindungsdomänen der Proteine herangezogen, weil außerhalb dieser stark konservierten Domäne eine nur sehr geringe Homologie zwischen den Sequenzen besteht. Über die gesamte Länge der Aminosäuresequenz beträgt die Homologie nur 20-25 % Identität, während die DNA-Bindungsdomänen eine 60-85 %ige Identität der Aminosäuren zeigen. Es wurde auch nur eine Auswahl von gut charakterisierten Transkriptionsfaktoren, der mehreren hundert in den Datenbanken vorhandenen Sequenzen von AP2/ERF-

Transkriptionsfaktoren, für diese Analyse herangezogen. Umfassende phylogenetische Analysen dieser Transkriptionsfaktoren-Klasse sind bereits publiziert wurden (Sakuma *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2006 a; Shigyo *et al.*, 2006). Auf diesen basieren weitere Unterteilungen, die zum Teil auch Motive außerhalb der DNA-Bindungsdomäne einbeziehen (Nakano *et al.*, 2006 a).

Legende zur Abb. 3.14: (folgende Seite) Kladogramm der DNA-Bindungsdomänen von 75 Transkriptionsfaktoren der AP2/ERF-Familie. Das Sequenzalignment wurde unter Verwendung des Clustal W-Algorithmus (Thompson *et al.*, 1994) erstellt. Das Kladogramm wurde mit TreeCon for Windows 1.3 (Van de Peer & De Wachter, 1994) nach der *Neighbor-joining*-Methode gezeichnet. Als Ausgangssequenz (Wurzel) wurde AP2-R1 festgelegt. Die drei Transkriptionsfaktoren EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 sind zur besseren Auffindung mit schwarzen Pfeilen markiert. R1 = erste DNA-Bindungsdomäne, * = EAR-Motiv, ^M = MCGGAI(I/L)-Motiv, Sequenzen: ABI4 (At2g40220, AAC39489), AP2-R1 (At4g36920, AAC13770), At1g06160 (=ORA59, NP_172106), At1g74930 (=ORA47, NP_177631), At2g47520 (NP_182274), At4g27950 (NP_194524), AtEBP (=RAP2.3, AAC49769), AtERF1 (auch ERF1A, =ORA1, At4g17500, BAA32418), AtERF2 (=ORA2, At5g47220, BAA32419), AtERF3 (At1g50640, BAA32420), AtERF4 (=ORA37, RAP2.5, At3g15210, BAA32421), AtERF5 (=ORA31, At5g47230, BAA32422), AtERF6 (At4g17490, BAA31525), AtERF7 (At3g20310, BAA96653), AtERF8 (At1g53170, BAB16084), AtERF9 (At4g28140, BAB18560), AtERF10 (At1g03800, BAB18561), AtERF11 (At1g28370, BAB62911), AtERF12 (At1g28360, BAB62912), AtERF13 (=ORA4, At2g44840, AAK48967), AtERF14 (At1g04370, AAB70439), AtERF15 (At2g31230, AAD20668), CBF1 (=DREB1B, At4g25490, AAC49662), CBF2 (=DREB1C, At4g25470, AAD15976), CBF3 (=DREB1A, At4g25480, AAD15977), CBF4 (=DREB1D, At5g51990, NP_200012) DDF1 (At1g12610, NP_172721), DDF2 (At1g63030, NP_176491), DREB2A (At5g05410, BAA33794), EcaERF1, EcaERF2, EcaERF3 (diese Arbeit), ERF1 (auch ERF1B, At3g23240, AAD03544), ERN1 (ABW06102), ESR1 (At1g12980, AAL56226), Gl15-R1 (AAC49567), GmEREBP1 (AAM45475), Ids1-R1 (AAC05206), JERF1 (AAK95687), LeERF1 (AAO34703), LeERF2 (AAO34704), LeERF3 (AAO34705), LeERF4 (AAO34706), LEP (At5g13910, AAF32292), NtCEF1 (AAP40022), NtERF1 (=EREBP1, BAA07321), NtERF2 (=EREBP2, BAA07324), NtERF3 (=EREBP3, BAA07322), NtERF4 (=EREBP4, BAA07323), NtJAP1 (CQ808845), NtORC1 (CQ808982), ORCA1 (CAB93939), ORCA2 (CAB93940), ORCA3 (CAB96899), OsEBP-89 (CAC83122), Pti4 (AAC50047), Pti5 (AAC49740), Pti6 (AAC49741), RAP2.1 (At3g50260, AAC49767), RAP2.2 (At3g14230, AAC49768), RAP2.4 (At1g22190, AAC49770), RAP2.6 (=ORA44, At1g43160, AAC49772), RAP2.9 (At4g06746, NP_849340), RAP2.10 (At5g52020, AAC49776), RAP2.11 (At5g19790, AAC49777), RAP2.12 (At4g34410, AAC49778), RAV1 (At1g13260, BAA34250), RAV2 (=RAP2.8, At1g68840, BAA34251), SMZ (At3g54990, AAS88428), SNZ (At2g39250, AAS88429), TINY (At5g25810, CAA64359), TINY2 (=DREB3, At5g11590, AAX38232), TOE1-R1 (=RAP2.7, At2g28550, NP_565674), TOE2 (At5g60120, NP_200820), TOE3-R1 (At5g67180, NP_201519), Tsi1 (AAC14323).

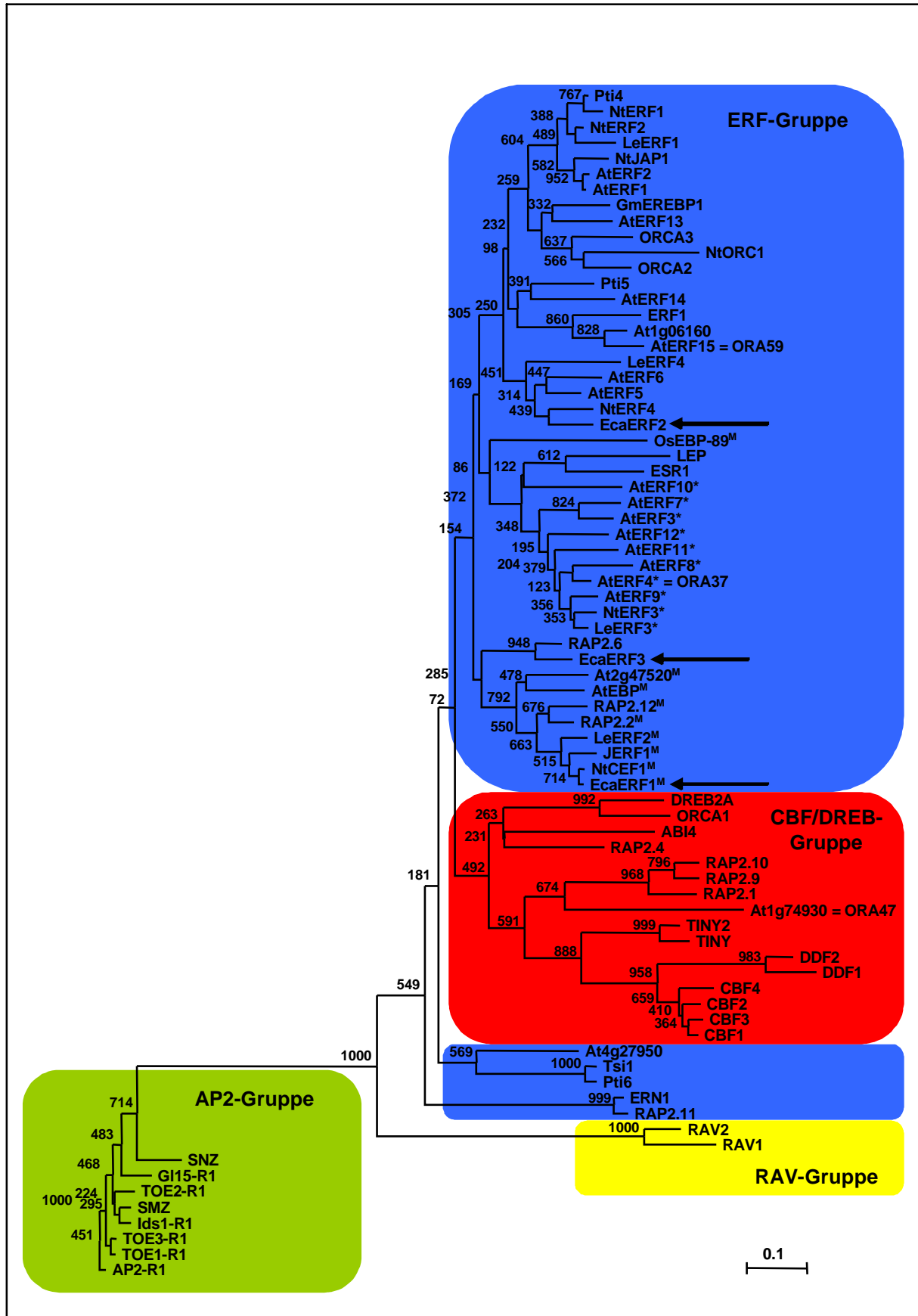


Abb. 3.14: Kladogramm der DNA-Bindungsdomänen der AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren.

Es ist zu erkennen, dass die verschiedenen „Zweige“ des Stammbaumes Mitglieder der einzelnen Unterfamilien vereinen. Zum einen stellt die AP2-Unterfamilie mit der ersten DNA-Bindungsdomäne von APETALA2 (AP2-R1) eine separate Gruppe dar. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind Glossy15 (G115-R1), Ids1 (Ids1-R1), beide aus *Z. mays* (Moose & Sisco, 1996; Chuck *et al.*, 1998), Schlafmütze (SMZ) und Schnarchzapfen (SNZ), die beide jeweils nur eine DNA-Bindungsdomäne besitzen (Schmid *et al.*, 2003), und die drei Transkriptionsfaktoren Target of EAT 1, 2 und 3 (TOE1-R1, TOE2, TOE3-R1), von denen TOE2 wiederum auch nur eine DNA-Bindungsdomäne besitzt (Aukerman & Sakai, 2003). Die zweiten DNA-Bindungsdomänen von AP2, G115, Ids1, TOE1 und TOE2 wurden für die Analyse ausgelassen, weil sie nicht sehr homolog zu den ersten DNA-Bindungsdomänen sind und als separate Gruppe innerhalb der AP2-Unterfamilie gruppieren. Ebenfalls von der Analyse ausgenommen wurde AINTEGUMENTA (ANT, At4g37750, Elliott *et al.*, 1996 und Klucher *et al.*, 1996), weil dieser innerhalb der AP2-Unterfamilie stark von APETALA2 abweicht und einen eigenen phylogenetischen Ursprung besitzt (Shigyo *et al.*, 2006). Die beiden Mitglieder der RAV-Unterfamilie, RAV1 und RAV2 (*related to* AP3/VP1, Kagaya *et al.*, 1999), liegen ebenfalls weit isoliert auf einem separaten „Ast“ des Stammbaumes.

Eine größere Gruppe bilden die Mitglieder der CBF/DREB-Unterfamilie. Zur ihr gehören sowohl die CBFs und die DREBs, die teilweise zwei Namen tragen (siehe Legende zur Abb. 3.14; Stockinger *et al.*, 1987; Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Haake *et al.*, 2002), als auch TINY (Wilson *et al.*, 1996), TINY2 (Wei *et al.*, 2005), DDF1 und DDF2 (Magome *et al.*, 2004), ABI4 (Finkelstein *et al.*, 1998) und vier RAP2- (*related to* AP2-) Proteine RAP2.1, RAP2.4, RAP2.9 und RAP2.10 (Okamura *et al.*, 1997). ORCA1 (Menke *et al.*, 1999 b) gehört ebenfalls in die CBF/DREB-Unterfamilie. Interessanterweise wird die Jasmonsäurebiosynthese in *A. thaliana* durch den AP2/ERF-Transkriptionsfaktor ORA47 (At1g74930) reguliert (Pré, 2006), der ebenfalls in die CBF/DREB-Unterfamilie gehört.

Die größte Gruppe dieser Transkriptionsfaktorklasse ist die EREBP/ERF-Unterfamilie. Zu ihr gehören auch die drei in dieser Arbeit identifizierten Proteine EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3. Die Namensgebenden Vertreter dieser Unterfamilie, die vier *Ethylene-Responsive Element Binding Proteins* (EREBP1-4) aus *N. tabacum* (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995), werden in der neueren Literatur auch als ERF (*Ethylene Response Factor*), wie die homologen Proteine aus *A. thaliana*, bezeichnet. Ebenfalls in dieser Unterfamilie befinden sich ORCA2 und ORCA3 aus *C. roseus* (Menke *et al.*, 1999 b; van der Fits & Memelink, 2001), vier Transkriptionsfaktoren aus *L. esculentum* (LeERF1-4; Tournier *et al.*, 2003), NtCEF1 (Lee *et al.*, 2005), NtJAP1 und NtORC1 (De Sutter *et al.*, 2005), JERF1 (Zhang

et al., 2004), Pti4, Pti5 und Pti6 (Zhou *et al.*, 1997), OsEBP-89 (Yang *et al.*, 2002), AtEBP (Büttner & Singh, 1997), ERF1 (Solano *et al.*, 1998), ESR1 (*enhancer of shoot regeneration 1*; Banno *et al.*, 2001; Kirch *et al.*, 2003), LEP (*leafy petiole*; van der Graaff *et al.*, 2000) und zahlreiche AtERF- und RAP2-Proteine aus *A. thaliana* (Okamuro *et al.*, 1997; Fujimoto *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2001; Oñate-Sánchez & Singh, 2002). At1g06160 und AtERF4 in dieser Gruppe werden auch als ORA59 bzw. ORA37 bezeichnet. ORA59 ist ein positiver Regulator vieler Jasmonat-responsiver Gene und vermittelt die die Integration der Signaltransduktion von Jasmonsäure und Ethylen (Pré *et al.*, 2008), während ORA37 ein negativer Regulator einiger Jasmonat- und Ethylen-responsiver Gene ist (Pré, 2006). ORA37 (AtERF4) enthält, ebenso wie AtERF3, AtERF7, AtERF8, AtERF9, AtERF10, AtERF11, AtERF12, NtERF3 und LeERF3 das konservierte EAR-Motiv, das für eine aktive Repression der Genexpression verantwortlich ist (Ohta *et al.*, 2001). AtERF11 ist auch als CEJ1 (*cooperatively regulated by ethylene and jasmonate 1*) beschrieben und wird synergistisch durch MeJA und Ethylen in seiner Expression induziert (Nakano *et al.*, 2006 c). Die DNA-Bindungsdomänen dieser Transkriptionsfaktoren (Gruppe VIII a; nach Nakano *et al.*, 2006 a) gruppieren in dem Stammbaum in Abbildung 3.14 sehr eng zusammen, obwohl dieses Motiv außerhalb der DNA-Bindungsdomäne nahe dem C-terminalen Ende des Proteins liegt.

Die drei in dieser Arbeit identifizierten Transkriptionsfaktoren EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 besitzen kein EAR-Motiv, jedoch enthält EcaERF1 das konservierte, N-terminale MCGGAI(I/L)-Motiv, das die Gruppe VII (nach Nakano *et al.*, 2006 a) charakterisiert. Weitere Transkriptionsfaktoren mit diesem Motiv sind OsEBP-89, AtEBP, LeERF2, JERF1, NtCEF1, RAP2.2, RAP2.12, At1g53910 und At2g47520.

EcaERF2 gehört zur Gruppe IX, zu der generell transkriptionelle Aktivatoren gezählt werden, welche oft auch in Verbindung mit der Genexpression zur Verteidigung vor Pathogenen gebracht werden. Außerdem wird die Expression der Transkriptionsfaktoren dieser Gruppe oft durch Phytohormone, die eine Rolle bei der Verteidigung spielen, wie Ethylen, Jasmonate und Salicylsäure, induziert.

EcaERF3 muss aufgrund der Homologie zu RAP2.6 und At5g13330 und At5g64750 (siehe a. Tabelle 3.5) zur Gruppe X gerechnet werden. At5g64750 (ABR1) wurde als Repressor der ABA-Signaltransduktion beschrieben (Pandey *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der Suche nach homologen Proteinen in der Proteinsequenzdatenbank (*Non-redundant*) sind in der **Tabelle 3.5** zusammengefasst. Es wurde die gesamte Aminosäuresequenz zur Abfrage genutzt. Im Bereich der DNA-Bindungsdomäne besitzen die Sequenzen

erwartungsgemäß die größte Übereinstimmung, aber auch außerhalb dieser Domäne befinden sich Bereiche mit ähnlichen Motiven. EcaERF1 zeigt die größte Ähnlichkeit NtCEF1 aus *N. tabacum*, der in Kallusgewebe stark exprimiert wird.

Tab. 3.5: Sequenzhomologie von EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 zu ERF-Transkriptionsfaktoren in der Proteinsequenzdatenbank. Die Homologie entspricht der Anzahl der identischen Aminosäuren in Prozent über verglichenen Bereich.

	Homologie (%)	Transkriptionsfaktor
EcaERF1	64 (126/194)	NtCEF1 (AAP40022) <i>N. tabacum</i>
	60 (142/233)	ERF (AAX84670) <i>Manihot esculenta</i>
	60 (130/216)	GhERF3 (AAX20013) <i>Gossypium hirsutum</i>
	62 (130/209)	ERF2 (AAX07458) <i>Gossypium hirsutum</i>
	62 (130/208)	FsERF1 (CAE54591) <i>Fagus sylvatica</i>
	61 (124/203)	JERF1 (AAK95687) <i>L. esculentum</i>
	62 (123/197)	JERF3 (AAQ91334) <i>L. esculentum</i>
EcaERF2	42 (144/336)	NtERF4 (BAA07323) <i>N. tabacum</i>
	41 (148/353)	VaERF5 (AAR37423) <i>Vitis aestivalis</i>
	39 (131/332)	NsERF4 (BAA97124) <i>Nicotiana glauca</i>
	41 (128/310)	DcERF1 (BAF75651) <i>Daucus carota</i>
	40 (133/326)	AtERF5 (BAA32422) <i>A. thaliana</i>
	42 (104/237)	LeERF4 (AAO34706) <i>L. esculentum</i>
EcaERF3	50 (121/240)	hypothetisches Protein (CAO71725) <i>Vitis vinifera</i>
	76 (61/80)	Os12g0168100 (BAF29271) <i>Oryza sativa</i> ssp. <i>japonica</i>
	59 (62/104)	ERF113 At5g13330 (AAS47615) <i>A. thaliana</i>
	72 (54/75)	ABR1 At5g64750 (AAP37839) <i>A. thaliana</i>
	49 (75/153)	RAP2.6 At1g43160 (AAC49772) <i>A. thaliana</i>
88 (59/67)	ERF110 At5g50080 (BAB10294) <i>A. thaliana</i>	

Die **Abbildung 3.15** zeigt ein Sequenzvergleich der DNA-Bindungsdomänen von EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 im Vergleich zu den DNA-Bindungsdomänen von anderen ERF- und CBF/DREB-Proteinen. Besonders die Aminosäuren, die in AtERF1 den direkten Kontakt mit dem GCC-Box Motiv der DNA herstellen (Allen *et al.*, 1998; in der Abb. 3.15 mit einem Stern markiert) sind in allen DNA-Bindungsdomänen mit Ausnahme von ERN1 konserviert. In den GCC-Box bindenden ERF-Proteinen sind die Aminosäuren Alanin (A) an Position 14 und Asparaginsäure (D) an Position 19 konserviert. Die an das DRE-Motiv bindenden CBF/DREB-Proteine besitzen an diesen Positionen Valin (V) und Glutaminsäure (E) (Sakuma *et al.*, 2002). In ERN1 sowie in ERN2 und RAP2.11 (=At5g19790) (nicht in Abb. 3.15 dargestellt) befinden sich an der Position 14 die Aminosäure V und an Position 19 die Aminosäure D. Damit nehmen sie eine Zwischenstellung ein. ERN1 und ERN2 binden an die

NF-Box mit dem Sequenzmotiv GCAGGC (Andriankaja *et al.*, 2007). Diese ähnelt nur entfernt der GCC-Box (GCCGCC), was vielleicht auch den Austausch der Aminosäuren Tryptophan (W) und Arginin (R) zu Serin (S) und Lysin (K) an den Positionen 10 und 18 der DNA-Bindungsdomäne toleriert. In DREB1A ist ebenfalls an der Position 10 Tryptophan gegen Serin ausgetauscht.

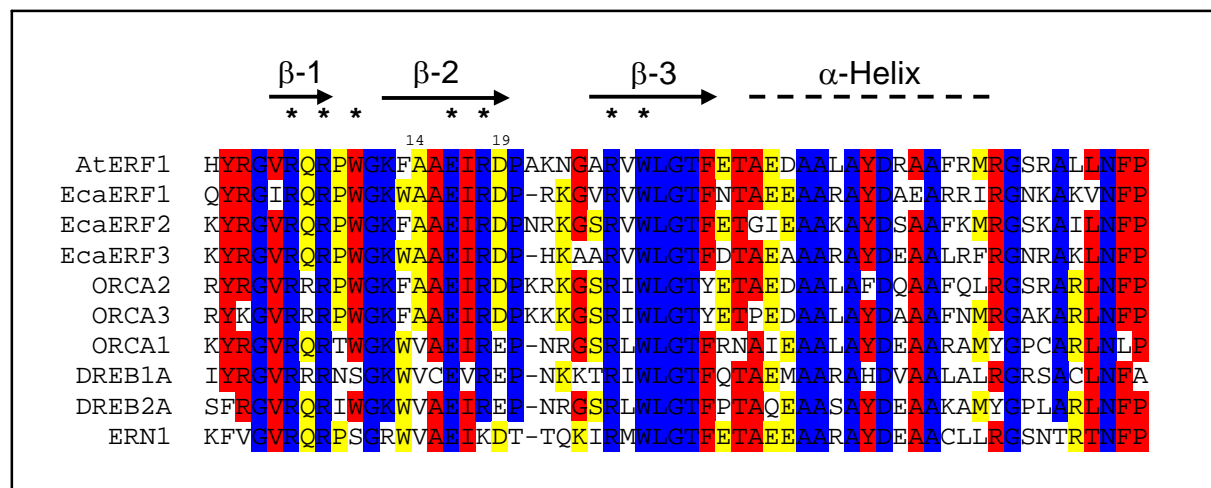


Abb. 3.15: Sequenzvergleich der ERF-DNA-Bindungsdomänen. Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente nach Allen *et al.* (1998) ist oben wiedergegeben. Aminosäuren, die mit den Nukleotiden der GCC-Box interagieren sind durch einen Stern markiert. Die Positionen der Aminosäuren 14 und 19 sind durch Ziffern gekennzeichnet. Das Sequenzalignment wurde mit dem Clustal W Algorithmus (Thomson *et al.*, 1994) durchgeführt. AtERF1 (At4g17500, BAA32418), EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 (diese Arbeit), ORCA1 (CAB93939), ORCA2 (CAB93940), ORCA3 (CAB96899), DREB1A (BAA33791 = CBF3 AAD15977), DREB2A (BAA33794), ERN1 (ABW06102).

3.4.2 Heterologe Expression des Transkriptionsfaktors EcaERF2 in *E. coli*

Um Aussagen über die Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors EcaERF2 an *cis*-regulatorische DNA-Elemente machen zu können, war es nötig das Protein heterolog zu exprimieren, um eine geeignete Menge für Bindungsversuche aufzureinigen. Doch die heterologe Expression in *E. coli* gestaltete sich nicht einfach. Für die ersten Versuche wurde der Vektor pQE30 in Kombination mit dem Expressionsstamm SG13009 (Qiagen) verwendet. Es wurden jedoch nur Proteinfragmente erhalten, die zudem meist auch unlöslich waren. Die erfolgreiche Expression gelang erst durch die Verwendung des pET41-Vektors und des Expressionsstammes Rosetta 2 (DE3). Dazu wurde der für die DNA-Bindungsdomäne und einige zusätzliche Aminosäuren codierende Bereich von EcaERF2 (siehe Markierung in Abb. 3.13) mittels PCR amplifiziert. Als Primer wurden 18F08ERFdom-for und

18F08ERFdom-rev verwendet (siehe Tab. 7.1). Das PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pET41 Ek/LIC (Novagen) ligiert und in den *E. coli*-Stamm NovaBlue transformiert. Durch die vektorcodierten Sequenzen entsteht nach der Translation ein Fusionsprotein aus der DNA-Bindungsdomäne von EcaERF2 und N-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST, 220 AS). Diese soll für eine verbesserte Löslichkeit des Proteins sorgen. Zusätzlich enthält das Fusionsprotein einen His-Tag und einen S-Tag. Diese können wie auch die GST zur Affinitätsreinigung verwendet werden. Die Abspaltung dieser vektorcodierten Sequenzen ist durch Enterokinase möglich. Insgesamt hat der N-terminale Fusionsteil aus GST, His-Tag, S-Tag und Enterokinase-Erkennungsstelle eine Länge von 277 AS. Der C-terminale Fusionsteil hat eine Länge von 108 AS, der sich aus 59 AS der DNA-Bindungsdomäne sowie 11 AS vor dieser und 38 AS nach dieser gelegenen Sequenz zusammensetzt. Insgesamt ergibt sich ein Fusionsprotein mit 385 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 43,9 kDa.

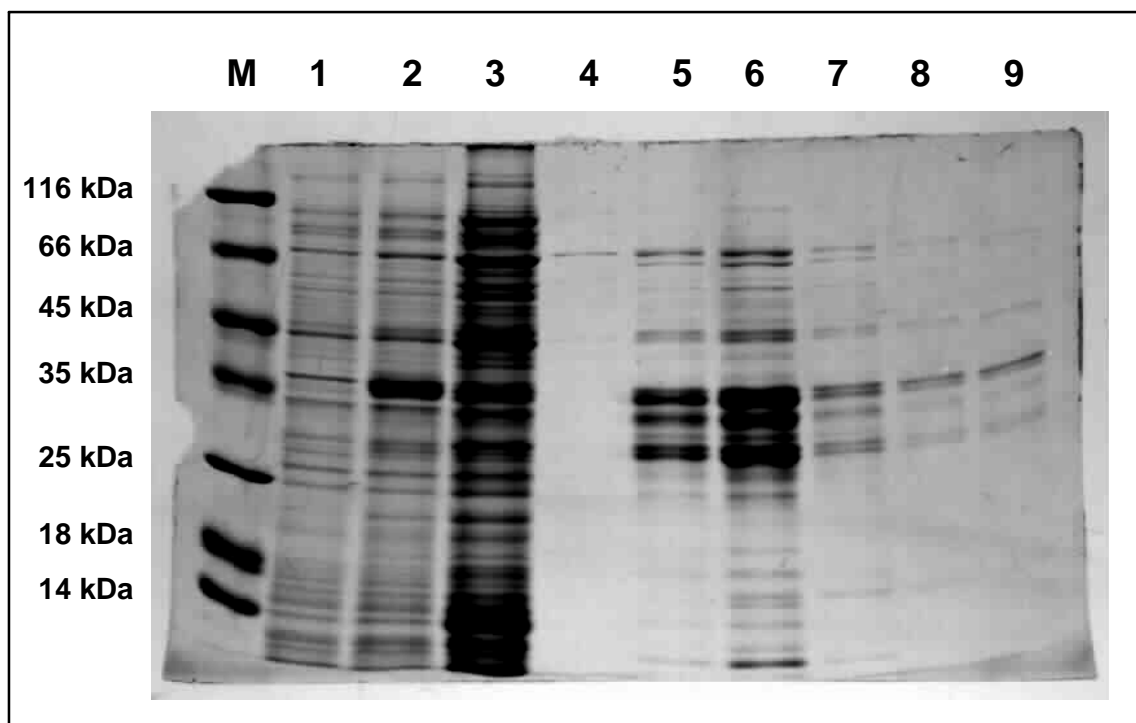


Abb. 3.16: Elektrophoretische Auftrennung von Proben der Proteinreinigung zur Gewinnung von rekombinantem EcaERF2-Protein. SDS-PAGE (12 %), M Proteinmarker (Fermentas), 1: vor der Induktion, 2: 16 h nach der Induktion, 3: Rohextrakt nach Lyse, 4: Durchfluss, 5-6: Elutionsfraktionen, 7-9: Fraktionen der PD10-Säule

Nach Identifizierung eines positiven Klons wurde das Plasmid in den Expressionsstamm Rosetta 2 (DE3) transformiert. Das rekombinante Protein wurde mittels Metall-Chelat-

Affinitätschromatographie am Talon-Harz gereinigt. Die **Abbildung 3.16** zeigt ein Polyacrylamidgel, welches die Reinigungsschritte der Proteinreinigung dokumentiert. Die Probe nach der Induktion (Spur 2) zeigt eine Bande bei ungefähr 35 kDa, die im Vergleich mit der Probe vor der Induktion (Spur 1) deutlich zugenommen hat. Die Elutionsfraktionen (Spuren 5 und 6) enthalten noch mehrere Peptide, von denen das größte nach der Entsalzung mittels PD10-Säule (Spuren 7-9) dominiert.

3.4.3 DNA-Bindungsstudien mittels Gelretardationsassays

Das durch die heterologe Expression gewonnene Transkriptionsfaktorprotein (Spuren 8 und 9) sollte nun auf die Fähigkeit an DNA-Elemente zu binden untersucht werden. Das *in vitro*-Bindungsverhalten kann experimentell mittels Gelretardationsassays analysiert werden. Die Methode des EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) beruht auf der verzögerten Wanderungsgeschwindigkeit einer an ein Protein gebundenen DNA-Probe im Gegensatz zur freien DNA-Probe während der Gelelektrophorese (Garner & Revzin, 1981; Fried & Crothers, 1981).

Da es sich bei dem Transkriptionsfaktor EcaERF2 um ein Mitglied der ERF-Familie handelt, wurde zuerst überprüft, ob eine Bindung an die GCC-Box erfolgt. Weiterhin wurden mit der GCC-Box verwandte *cis*-Elemente für die Bindungsexperimente ausgewählt. Die Sequenzen der verwendeten 32-36 bp langen Oligonukleotid-Duplicates sind in der **Abbildung 3.14** dargestellt. Die jeweiligen überstehenden 5'-Enden wurden zur radioaktiven Markierung unter Verwendung von [α -³²P]-dATP mittels des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die Sequenz der Oligonukleotide der GCC-Box (AGCCGCC) wurde aus dem Promotor des Berberinbrückenenzym (siehe Abb. 3.10) abgeleitet. In der mutierten GCC-Box (mutGCC-Box, ATCCTCC) wurden die beiden Guaninreste gegen Thyminreste ausgetauscht. Das JERE (*jasmonate and elicitor-responsive element*, AGACCGCC) des Strictosidin-Synthase Gens aus *C. roseus* unterscheidet sich nur in der Insertion eines Adeninrestes vor dem ersten Guaninrest von der Kern-GCC-Box-Sequenz (Menke *et al.*, 1999 b). Die S-Box (AGCCACC), ein *cis*-Element des Elicitor-responsiven *ELI7* Gens der Petersilie (*Petroselinum crispum*) unterscheidet sich von der Kern-GCC-Box-Sequenz durch den Austausch des zweiten Guaninrestes durch einen Adeninrest (Kirsch *et al.*, 2000). Die Oligonukleotide des DRE (*dehydration-responsive element*, TACCGAC) wurden aus dem *rd29A* Gen (auch als *cor78* und *lti78* benannt) von *A. thaliana* hergeleitet (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). Ferner wurde noch die W1-Box (TTGACC) des *PR-1* Gens

der Petersilie (Rushton *et al.*, 1996) als ein mit der GCC-Box unverwandtes *cis*-Element und Bindungssequenz der WRKY-Transkriptionsfaktoren verwendet.

GCC-Box:	GAATTCGACAGAC AGCCGCC AAATCTGG CTGTCTGTTCGGCGGTTAGACCCTTAAG
mutGCC-Box:	GAATTCGACAGAC ATCCT CCAATCTGG CTGTCTGTAGGAGGTTAGACCCTTAAG
JERE:	GAATTC CACTCTT AGACCGC CTTCTTTG GTGAGAATCTGGCGGAAGAAACCTTAAG
DRE:	GAATTCATATCA TACCGAC ATCAGTT TATAGTATGGCTGTAGTCAACTTAAG
S-Box:	GAATTCAAAGTAC AGCCACC AAAGAGGACC TTTCATGTTCGGTGGTTTCTCCTGGCTTAAG
W1-Box:	GAATTC ACTTAATTTGACCG GAGTAAC TGAATTAACTGGCTCATTGCTTAAG

Abb. 3.14: Verwendete Oligonukleotide für die EMSA. Die jeweiligen Kern-Sequenzen der *cis*-Elemente sind fett gedruckt. Die Sequenz GAATTC ist ein *EcoRI*-Adapter, der mittels des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I unter Verwendung von [α - 32 P]-dATP aufgefüllt wurde. Für die GCC-Box-ähnlichen *cis*-Elemente sind die von der GCC-Box abweichenden Nukleotide unterstrichen.

Die **Abbildung 3.15** zeigt einen EMSA zur Ermittlung des Bindungsverhaltens von EcaERF2-DBD an verschiedene DNA-Elemente. Die obere Bande entspricht dem Komplex aus Protein und gebundener DNA. Im unteren Bereich des Gels ist die restliche ungebundene DNA zu erkennen. Die Oligonukleotid-Proben für das DRE und die W1-Box sind mit 32 bp die kürzesten und migrieren etwas weiter in Polyacrylamidgel als die restlichen Proben. Deutlich ist die Bindung von EcaERF2-DBD an die GCC-Box (2. und 8. Spur) zu erkennen. Für die Negativkontrolle (in Spur 1) wurde kein Protein zugegeben. Es erfolgt ebenfalls keine Bindung von EcaERF2-DBD an die mutierte GCC-Box (in Spur 3). Das DRE (in Spur 5) und die W1-Box (in Spur 7) binden ebenfalls nicht an EcaERF2-DBD. Eine leichte Bindung an die S-Box (in Spur 6) und eine noch schwächere Bindung an das JERE (in Spur 4) ist zu beobachten.

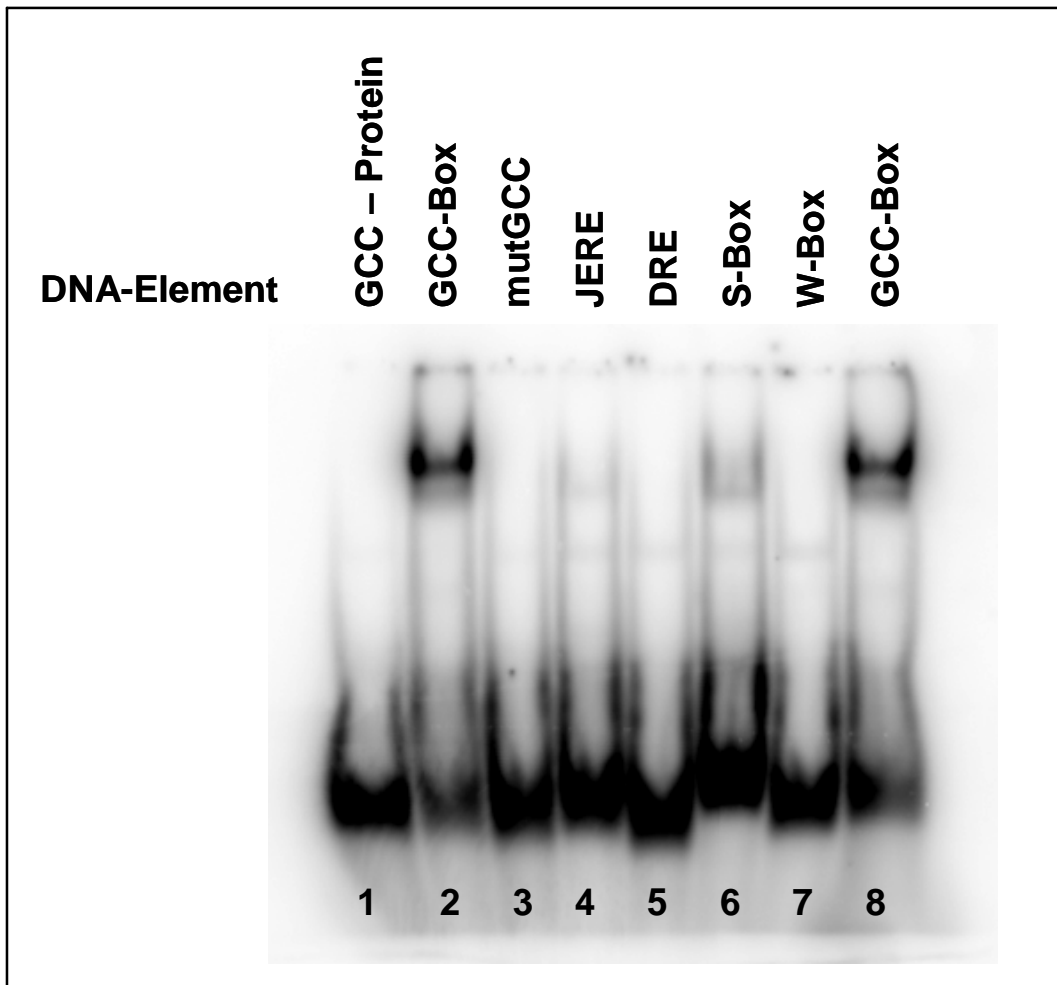


Abb. 3.15: EMSA von EcaERF2-DBD mit verschiedenen DNA-Elementen. Details zu den verwendeten *cis*-Elementen und Oligonukleotiden sind der Abb. 3.14 und dem Text zu entnehmen.

Die **Abbildung 3.16** zeigt den Wettbewerbsversuch der Bindung von EcaERF2-DBD an die GCC-Box. Die obere Bande entspricht wiederum dem Protein-DNA-Komplex und im unteren Bereich des Geles sind die freien DNA-Proben zu erkennen. Der Bindungsreaktion wurde zur Konkurrenz ein vielfacher Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden zugegeben. In der Negativkontrolle wurde kein Protein zugegeben. Die beiden Positivkontrollen enthielten keine Kompetitor-DNA. Selbst bei einem fünfzigfachen molaren Überschuss an unmarkierter GCC-Box als Kompetitor ist noch eine Bindung an EcaERF2-DBD nachzuweisen. Ab einem molaren Überschuss des Kompetitors von einhundert- bis fünfhundertfach ist die Bindung nur noch zu erahnen.

Damit kann gezeigt werden, dass die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors EcaERF2 *in vitro* spezifisch und mit hoher Affinität an die GCC-Box bindet.

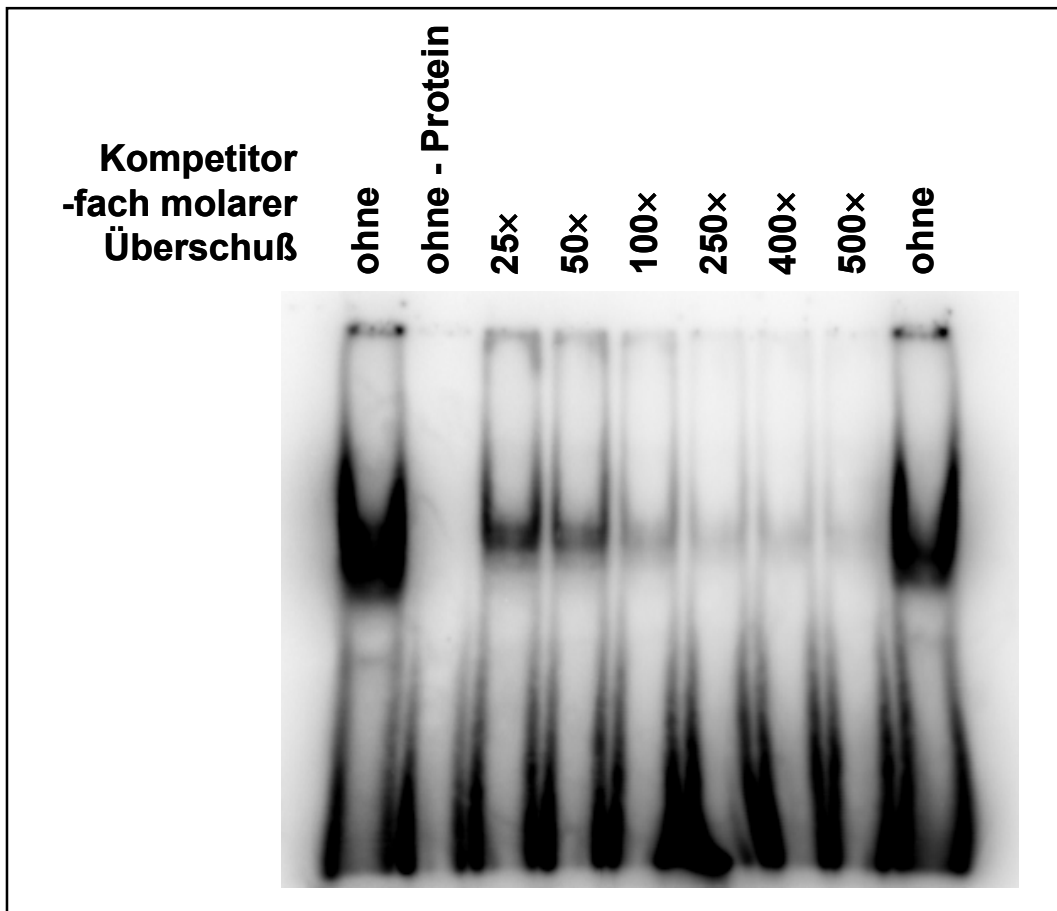


Abb. 3.16: Kompetitionsversuch (EMSA) zur Bindung von EcaERF2-DBD an die GCC-Box. Angegeben ist der molare Überschuss an unmarkierten Oligonukleotid gegenüber dem ^{32}P -markierten GCC-Box Oligonukleotid.

Diese Ergebnisse zeigen, dass EcaERF2 *in vitro* sequenzspezifisch und mit hoher Affinität an die GCC-Box bindet. Das Proben-Oligonucleotid für den EMSA wurde aus dem BBE-Promotor abgeleitet. Abgesehen von den sechs Nucleotiden am Anfang und am Ende, die zur radioaktiven Markierung verwendet wurden, ist die Sequenz über eine Länge von 21 bp identisch zur Nucleotidsequenz im BBE-Promotor. Damit ist davon auszugehen, dass EcaERF2 an die GCC-Box des BBE-Promotors bindet und dessen Expression aktiviert.

4 Diskussion

4.1 EST-Sequenzierung und globale Genexpressionsanalysen als Methoden zur Identifizierung neuer cDNAs

In den letzten Jahren haben die Methoden der *Functional Genomics* zunehmend Anwendung in der Erforschung der Naturstoffbiosynthese von Pflanzen gefunden. Zu diesen Methoden werden neben der in dieser Arbeit durchgeführten EST-Sequenzierung (Adams *et al.*, 1991) auch die Sequenzierung vollständiger pflanzlicher Genome, wie z.B. der von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) gezählt. Neue Methoden der DNA-Sequenzierung werden in Zukunft noch mehr und bedeutend schneller Sequenzinformationen liefern (Margulies *et al.*, 2005; Shendure *et al.*, 2005). Parallel dazu war die Entwicklung von Datenbanken zur Speicherung von Sequenz- und Strukturdaten eine wichtige Voraussetzung für die vergleichende Genomik (Wheeler *et al.* 2008). Weiterhin wurden Methoden zur Untersuchung der Genexpression entwickelt, die möglichst große Teile des Transkriptoms umfassen. Zu diesen gehören SAGE (*serial analysis of gene expression*, Velculescu *et al.*, 1995), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*, Vos *et al.*, 1995; Money *et al.*, 1996) sowie Array-Hybridisierungen auf Membran- oder Glassoberflächen (Macro- und Microarrays; Schena *et al.*, 1995; DeRisi *et al.*, 1997; Desprez *et al.*, 1998). Diese Verfahren zur Genanalyse werden durch Methoden der Proteomanalyse (Aebersold & Mann, 2003; Fenn *et al.*, 1989; Henzel *et al.*, 1993; Washburn *et al.*, 2001) und zur Untersuchung des Metaboloms (Oliver *et al.*, 1998; Fiehn *et al.*, 2000) erweitert. Das Ziel der *Systems Biology* ist es u. a. mit Hilfe der (Bio-) Informatik die Integration zwischen Transkriptom-, Proteom- und Metablomanalysen herzustellen.

Bei der Sequenzierung von ESTs wird meistens das 5'-Ende der cDNA bevorzugt, weil dieses mehr Protein-codierende Sequenz enthält, im Gegensatz zu den 3'-Enden, die oftmals zu einem erheblichen Anteil aus untranslatierten Regionen (UTR) bestehen. Die 3'-Enden von cDNAs bieten jedoch den Vorteil, dass sie mehr einzigartige und dadurch genspezifische Sequenzen (oft die UTR) enthalten und somit die Unterscheidung von paralogen Genen ermöglichen. Die EST-Sequenzierung bietet einige Vorteile (s. a. Rudd, 2003): Die Methode ist relativ preisgünstig und erlaubt eine hohe Automatisierung. Zudem können Sequenzen von Organismen generiert werden, bei denen eine Sequenzierung des vollständigen Genoms aufgrund der Größe in naher Zukunft nicht möglich ist. Die Anzahl der erhaltenen EST-Sequenzen einer cDNA lässt zudem eine grobe Abschätzung auf ihr Expressionsniveau zu

(Ewing *et al.* 1999). Nachteilig ist vor allem die hohe Anzahl von redundanten Sequenzen. Außerdem erlauben EST-Projekte nicht die vollständige Repräsentation aller Gene eines Organismus, da die Expression einzelner Gene auf einen bestimmten Zeitpunkt oder spezielle Zelltypen beschränkt sein kann. Zwei Methoden zum Ausgleich des relativen Vorkommens abundanter und seltener Transkripte in einer cDNA-Bibliothek stellen Normalisierung und Subtraktion sowie „*oligonucleotide fingerprinting*“ dar (Bonaldo *et al.*, 1996, Herwig *et al.*, 2002).

Zur Identifizierung spezifischer cDNAs ist die Wahl des richtigen Gewebes und der Zeitpunkt der Probennahme von entscheidender Bedeutung. In einer cDNA-Bibliothek aus Epidermiszellen von *C. roseus* konnten sämtliche bekannte Gene der Biosynthese von Terpenindolalkaloiden sowie mehrere Kandidaten für neue Biosynthesegene identifiziert werden, was die hohe Spezialisierung der Epidermis für die Sekundärmetabolitproduktion zeigt (Murata *et al.*, 2008). Zuvor wurden drei weitere Arbeiten publiziert, welche die Generierung von EST-Sequenzen und cDNA-AFLP-Analysen zur Untersuchung der Terpenindolalkaloidbiosynthese in *C. roseus* beschreiben, aber weniger spezifische cDNA-Sequenzen identifizierten (Murata *et al.*, 2006; Shukla *et al.*, 2006; Rischer *et al.*, 2006).

Mehrere weitere Veröffentlichungen belegen den erfolgreichen Einsatz der EST-Sequenzierung zur Untersuchung des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels: Zur Untersuchung der Biosynthese der ätherischen Öle in der Pfefferminze (*Mentha × piperita*) und in Basilikum (*Ocimum basilicum*) wurden ESTs aus cDNA-Bibliotheken der sekretorischen Drüsenzellen von Trichomen sequenziert, von denen ein großer Anteil (25 bzw. 13 %) aus cDNAs bestand, die für bekannte biosynthetische Enzyme codieren (Lange *et al.*, 2000; Gang *et al.*, 2001). Die Sequenzierung von cDNAs einer Bibliothek mit MeJA induzierter Suspensionskulturzellen von *Taxus cuspidata* zeigte eine relativ hohe Abundanz von zwölf bekannten Transkripten und lieferte sechs weitere Kandidaten für die insgesamt neunzehn enzymatische Schritte umfassende Biosynthese des Taxols (Jennewein *et al.*, 2004). Die EST-Sequenzierung von cDNAs aus drüsigen Trichomen (Lupulindrüsen) des Hopfen (*Humulus lupulus*) führte zur Identifizierung von Genen des Terpenoid-, des Bittersäure- (Humulon) und des Xanthohumol-Stoffwechsels und einer neuen Desmethylxanthohumol-6'-O-Methyltransferase (Nagel *et al.*, 2008). Durch einen ähnlichen Ansatz wurden auch die Monoterpen-Synthase 2 und die Sesquiterpen-Synthase 1 aus Hopfen identifiziert (Wang *et al.*, 2008). Die Kombination von EST-Sequenzierung und Expressionsanalysen führte auch zur Identifikation von neuen Genen in der Biosynthese von Aromastoffen der reifen Erdbeere und des Blütenduftes der Rose (Aharoni *et al.*, 2000; Guterman *et al.*, 2002). Die Biosynthese von Nikotin wurde in mit

MeJA elicierten Tabak BY-2 Suspensionszellen mit Hilfe einer cDNA-AFLP-Methode untersucht (Goossens *et al.*, 2003). Aus mit MeJA induzierten Wurzelkulturen von Ginseng (*Panax ginseng*) wurde eine EST-Datenbank angelegt, um die Biosynthese der zu den Saponinen gehörenden Ginsenoide zu untersuchen (Choi *et al.*, 2005).

Allein für die Untersuchung der Benzylochinolinalkaloidbiosynthese wurden bislang ESTs aus *P. somniferum* (Ziegler *et al.*, 2005 und 2006; Zulak *et al.*, 2007), *A. mexicana* (Diaz-Chávez, 2009) und *C. japonica* (Morishige *et al.*, 2002 und Kokabu *et al.*, in Vorbereitung) sequenziert. Zusätzliche ESTs aus *E. californica* wurden zur vergleichenden Genomik der Angiospermen generiert (Albert *et al.*, 2005; Carlson *et al.*, 2006).

4.1.1 Funktionell charakterisierte cDNAs der Benzylochinolinalkaloidbiosynthese und Kandidaten-cDNAs

Durch die Verwendung einer elicierten Suspensionszellkultur von *E. californica* ist es in dieser Arbeit gelungen mehrere neue cDNAs der Benzylochinolinalkaloid-Biosynthese mittels EST-Sequenzierung zu annotieren. Vergleiche mit Proteinsequenzen aus den Datenbanken ergaben jeweils mehr als 70 % Sequenzidentität zu den orthologen Proteinen.

Die in dieser Arbeit generierten EST-Sequenzen hatten eine durchschnittliche Länge von 450 bp und damit eine angemessene Länge für Homologievergleiche in den Datenbanken. Die Annotation der EST-Sequenzen erfolgte manuell in Anlehnung an das System vom MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*, Mewes *et al.*, 2000), was bei dieser Anzahl von Sequenzen noch möglich ist und gleichzeitig die volle Kontrolle über den Prozess erlaubt. Für einen größeren Umfang bietet sich jedoch ein automatisiertes System zur Annotation an, wobei es mehrere Softwarelösungen und verschiedene Schemata zur systematischen Klassifikation von Proteinsequenzen (z.B. MIPS (FunCat; Ruepp *et al.*, 2004) und GO (*Gene Ontology*; The Gene Ontology Consortium, 2000) gibt.

Nach der Annotation (siehe Abb. 3.2 a-c) zeigten 60 % der Sequenzen Homologie zu bekannten Proteinen, von denen wiederum 22 % dem Metabolismus zuzurechnen waren. Zwei Drittel (67,5 %) entfielen davon auf den Primärstoffwechsel und rund ein Drittel (32,5 %) auf den Sekundärstoffwechsel. Die Alkaloidbiosynthese hatte mit 22,5 % einen großen Anteil am gesamten Metabolismus. Insgesamt zeigten 8 % der EST-Sequenzen Homologie zu Proteinen der Alkaloidbiosynthese. Das ist sicherlich auf die Verwendung einer elicierten Zellkultur zurückzuführen. Ein weiterer Vorteil dieser nicht-photosynthetisch aktiven Zellkultur macht sich im Fehlen von ESTs der Photosynthese bemerkbar, die oft einen

großen Anteil der Gesamtsequenzen ausmachen (Faccioli *et al.*, 2001; Goodwin *et al.*, 2004; Iturriaga *et al.*, 2006; Mráceka *et al.*, 2006).

4.1.1.1 Methyltransferasen der Benzylochinolinalkaloidbiosynthese

Die Funktionalität der 4'-OMT und der 6-OMT konnte durch heterologe Expression in *E. coli* bewiesen werden (Grobe, 2005). Die gereinigte 4'-OMT setzt neben dem endogenen Substrat (*S*)-3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin auch Laudanosolin, Norlaudanosolin und 6-*O*-Methylnorlaudanosolin um. Die Methylierung erfolgt ausschließlich am Benzylrest der getesteten Substrate und zeigt eine strenge Stereoselektivität zugunsten des *S*-Enantiomers. Die rekombinante 6-OMT akzeptiert Norcoclaurin, Laudanosolin, Norlaudanosolin, 7-*O*-Methylnorlaudanosolin und Norprotosinomenin als Substrate. Sie methyliert ausschließlich den Isochinolinrest der getesteten Substrate und zeigt keine Stereoselektivität gegenüber dem endogenen Substrat Norcoclaurin. Das Vorhandensein einer spezifischen 6-OMT in *E. californica* Zellkulturen ist bemerkenswert im Hinblick auf eine Veröffentlichung von Inui *et al.* (2007). In dieser Arbeit wurde die 6-OMT aus *C. japonica* ektopisch in Suspensionszellkulturen von *E. californica* exprimiert und eine siebeneinhalbfache Steigerung der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidgehalte gemessen. Die ektopische Expression der 4'-OMT aus *C. japonica* hatte dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidgehalte in den transgenen Zellen. Daraus schlossen sie, dass die Expression der 6-OMT in *E. californica* der limitierende Faktor der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidbiosynthese ist. Aus dem Fehlen einer zur 6-OMT homologen Sequenz in der *Floral Genome Project* (FGP) EST-Datenbank (auch wenn in der Publikation von Carlson *et al.*, (2006) diese in Tab. 4 aufgeführt ist) und dem Scheitern der Versuche zur PCR-Amplifikation mittels degenerierten Primern aus genomischer DNA und cDNA postulierten sie den Verlust der 6-OMT in *E. californica* Zellkulturen. Zudem besaß die heterolog in *E. coli* exprimierte 4'-OMT aus *E. californica* sowohl 4'-OMT- als auch 6-OMT-Aktivität, was die Autoren zu der Annahme führte, dass in ihren Zellkulturen die fehlende 6-OMT durch die 6-OMT-Aktivität der 4'-OMT kompensiert wurde (Inui *et al.*, 2007). In den Genexpressionsanalysen in dieser Arbeit konnte jedoch das Transkript der 6-OMT als MeJA- und Hefeelictor induziert nachgewiesen werden. Möglicherweise wurde in den ESTs des FGP keine cDNA der 6-OMT gefunden, weil diese aus Blütenknospen generiert wurden und die 6-OMT in diesem Gewebe niedrig exprimiert wird. Zellkulturen können sich zudem je nach Kulturbedingungen und Gewebe, aus welchem sie gewonnen wurden, stark voneinander

unterscheiden. Gegebenenfalls ist auch somaklonale Variation auch ein Grund dafür, dass Inui *et al.* keine 6-OMT in ihrer *E. californica* Zellkultur gefunden haben.

Mit Hilfe der ESTs aus dem FGP wurde zudem eine Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7-OMT) aus *E. californica* mit Homologie zur 7-OMT aus *P. somniferum* kloniert und charakterisiert (Fujii *et al.*, 2006). Die Transkripte der 7-OMT wurden auch in den Genexpressionsstudien dieser Arbeit als durch den Hefeelicitor und MeJA induziert identifiziert (siehe Abb. 3.4 a und 3.5).

Ausgehend von den beiden cDNA-Klonen Eca 21G08 und Eca 24B04 wurde mittels RACE-PCR die vollständige cDNA-Sequenz der CNMT aus *E. californica* generiert. Die Aminosäuresequenz besitzt 70 % Identität zur CNMT aus *P. somniferum* und ihr Transkript wird durch MeJA und Hefeelicitor induziert (siehe Abb. 3.5 und Abb. 3.8). Besonders in den Northern Blots zeigt die vermutliche CNMT ein mit der 4'- und der 6-OMT identisches Expressionsprofil. Der letztendliche Beweis für die Identität der CNMT wäre jedoch durch heterologe Expression und Charakterisierung des gereinigten Enzyms zu erbringen.

Die Aminosäuresequenz des cDNA-Klons Eca 04E05 zeigt zwar ebenso wie die (*S*)-Tetrahydroprotoberberin-(*cis*)-*N*-Methyltransferase (TNMT) aus *P. somniferum* Homologie zu Cyclopropanfettsäuresynthasen und zwei putativen *N*-Methyltransferasen (At4g33110 und At4g33120) aus *A. thaliana*, jedoch ist die Homologie zur TNMT aus *P. somniferum* mit 48 % sehr gering. Die beiden *O*-Methyltransferasen zeigen mehr als 70 % Sequenzidentität zu ihren Homologen aus *P. somniferum*. Zudem wird das Transkript der TNMT durch eine *Botrytis cinerea* Elicitorpräparation induziert (Liscombe & Facchini, 2007; Zulak *et al.*, 2007). Das Expressionsprofil der cDNA Eca 04E05 zeigt dagegen nicht die erwartete Transkriptakkumulation nach Elicitierung oder MeJA-Applikation. Damit stellt Eca 04E05 (NMT) wahrscheinlich nicht die cDNA der TNMT dar. Eine Funktion als CNMT kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Eca 04E05 könnte aber für eine andere *N*-Methyltransferase des Benzylisochinolinalkaloidstoffwechsels codieren, deren Expression nicht induzierbar ist.

4.1.1.2 Cytochrom-P450-Enzyme der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese

Viele Reaktionen in der Synthese von Benzylisochinolinalkaloiden werden durch Cytochrom-P450-Enzyme katalysiert. In den EST-Sequenzen wurden insgesamt sechs Sequenzen mit Homologie zur Canadin-Synthase CYP719A1 aus *C. japonica* (Ikezawa *et al.*, 2003) gefunden, die zu zwei verschiedenen cDNAs gehörten. Die Proteine wurden nach der Nomenklatur für P450-Enzyme CYP719A2 (Eca 13F06) und CYP719A5 (Eca 02E03)

genannt. Die Transkripte beider Cytochrome sind durch MeJA oder den Hefeelicitor induzierbar und zeigen ein ähnliches Expressionsprofil wie andere an der Alkaloidbiosynthese beteiligte Enzyme (siehe Abb. 3.4a, 3.5 und 3.8). In den EST-Sequenzen des FGP fanden sich insgesamt 18 Sequenzen mit Homologie zu CYP719A, die sich zu vier unterschiedlichen partiellen cDNAs zusammenführen ließen und als CYP719A9, CYP719A10, CYP719A11 und CYP719A12 klassifiziert wurden. Für *E. californica* wurden zwei weitere Methylenedioxybrückenenzyme, CYP719A2 und CYP719A3, gefunden, die beide Stylopin-Synthase-Aktivität zeigten (Ikezawa *et al.*, 2007). Mit dem Namen CYP719A4 wurde die (*S*)-Canadin-Synthase aus *T. flavum* publiziert (Samanani *et al.*, 2005), für die der Nachweis der Enzymaktivität jedoch noch aussteht. Aus *A. mexicana* wurden die cDNAs der Cheilanthifolin-Synthase (CYP719A14) und der Stylopin-Synthase (CYP719A13) isoliert (Diaz-Chávez, 2009). CYP719B1 aus *P. somniferum*, mit nur 51 % Sequenzidentität zu CYP719A1, CYP719A2 und CYP719A5, besitzt Salutaridin-Synthase-Aktivität (Gesell, 2008). In den Datenbanken befinden sich zusätzlich noch die Sequenzen von Mitgliedern der CYP719-Familie aus der Akelei (engl. Columbine, *Aquilegia formosa* × *A. pubescens*, Hodges *et al.*, unveröff.). Diese große Anzahl an CYP719-Homologen (eine Übersicht gibt **Tab. 4.1**), mit vermutlich allein acht Vertretern in *E. californica*, ist sehr überraschend. Außerdem scheint die Familie der CYP719-Enzyme spezifisch für die Ranunculales zu sein (Nelson *et al.*, 2004) und im Laufe der Evolution in dieser Ordnung eine starke Duplikation und Spezialisierung auf den Benzylisochinolinalkaloidmetabolismus erfahren zu haben. Aufgrund der nahezu vollständigen Identität mit CYP719A2 (Differenz in nur einer Aminosäure) ist es sehr wahrscheinlich, dass das in dieser Arbeit identifizierte CYP719A2 (Eca 13F06) ebenfalls eine Stylopin-Synthase ist. CYP719A5 (Eca 02E03) dagegen könnte die noch fehlende Cheilanthifolin-Synthase sein. Dafür sprechen das Expressionsprofil nach Elicitierung und die Gruppierung auf einem eigenen Ast, zusammen mit CYP719A14, im Stammbaum der CYP719-Sequenzen (siehe **Abb. 4.1**).

Tatsächlich wurde in einer kürzlich erschienenen Publikation für CYP719A5 Cheilanthifolin-Synthase-Aktivität nachgewiesen (Ikezawa *et al.*, 2009). Die Expression von CYP719A5 fand hauptsächlich in der Wurzel und zu einem geringeren Anteil in kultivierten Suspensionszellen statt. Das Transkript war durch MeJA elicitierbar und erreichte nach 12 Stunden ein Maximum, das bis 48 Stunden erhöht blieb. Die Expression der weiteren identifizierten CYP719A-Proteine war ebenfalls durch MeJA induzierbar. Für CYP719A9 wurde (*R,S*)-Retikulin als Substrat identifiziert und eine Funktion in der Biosynthese der Pavinalkaloide postuliert, was mit der dominanten Expression von CYP719A9 im Blatt und dem

Vorkommen dieses Alkaloidtyps in oberirdischen Pflanzenteilen übereinstimmt. Für CYP719A11 und CYP719A17 wurden keine enzymatischen Aktivitäten publiziert (Ikezawa *et al.*, 2009).

Tab. 4.1: Mitglieder der CYP719-Familie aus verschiedenen Spezies und ihre Funktion. Nomenklatur und Daten nach Dr. D. Nelson, University of Tennessee, Memphis, USA (<http://drnelson.utmem.edu/biblioD.html>). ¹⁾ Enzymaktivität wurde nicht bestimmt.

Name laut Nomenklatur	Funktion	Spezies	Referenz
CYP719A1	Canadin-Synthase	<i>C. japonica</i>	Ikezawa <i>et al.</i> , 2003
CYP719A2	Stylopin-Synthase	<i>E. californica</i>	diese Arbeit und Ikezawa <i>et al.</i> , 2007
CYP719A3	Stylopin-Synthase	<i>E. californica</i>	Ikezawa <i>et al.</i> , 2007
CYP719A4	Canadin-Synthase ¹⁾	<i>T. flavum</i>	Samanani <i>et al.</i> , 2005
CYP719A5	Cheilanthifolin-Synthase	<i>E. californica</i>	diese Arbeit und Ikezawa <i>et al.</i> 2009
CYP719A6-A8	unbekannt	<i>Aquilegia formosa</i> × <i>Aquilegia pubescens</i>	unveröffentlicht
CYP719A9	setzt (R,S)-Retikulin um	<i>E. californica</i>	Ikezawa <i>et al.</i> 2009
CYP719A10-A12	unbekannt	<i>E. californica</i>	Carlson <i>et al.</i> , 2006 Ikezawa <i>et al.</i> , 2009
CYP719A13	Stylopin-Synthase	<i>A. mexicana</i>	Diaz-Chávez, 2009
CYP719A14	Cheilanthifolin-Synthase	<i>A. mexicana</i>	Diaz-Chávez, 2009
CYP719A17	unbekannt	<i>E. californica</i>	Ikezawa <i>et al.</i> , 2009
CYP719B1	Salutaridin-Synthase	<i>P. somniferum</i>	Gesell, 2008

Ein Versuch der heterologen Expression von CYP719A2 und CYP719A5 im Baculovirus/*S. frugiperda*-System war nicht erfolgreich und es konnte weder ein CO-Differenzspektrum noch Enzymaktivität gemessen werden. Bisher war dieses System mehrfach erfolgreich für die heterologe Expression von P450-Enzymen verwendet wurden (Kraus & Kutchan, 1995; Pauli & Kutchan, 1998; Schalk & Croteau, 2000; Jennewein *et al.*, 2001). Kürzlich wurde publiziert, dass die Modifikation des hydrophoben N-Terminus durch Austausch der Membranankerdomäne oder Mutation einer einzigen Aminosäure des Linkers (Valin32 zu Alanin) die Expression von katalytisch aktiven Enzymen in Sf9-Insektenzellen verbessert (Mao *et al.*, 2008). Es könnte auch versucht werden aktive Enzyme durch die Verwendung eines alternativen Expressionssystems wie z. B. Hefe, Spalthefe (*Schizosaccharomyces pombe*) oder *E. coli* zu erhalten (Hotze *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 2000; Haudenschild *et al.*, 2000; Irmeler *et al.*, 2000; Collu *et al.*, 2001; Schuler & Werck-Reichhart, 2003).

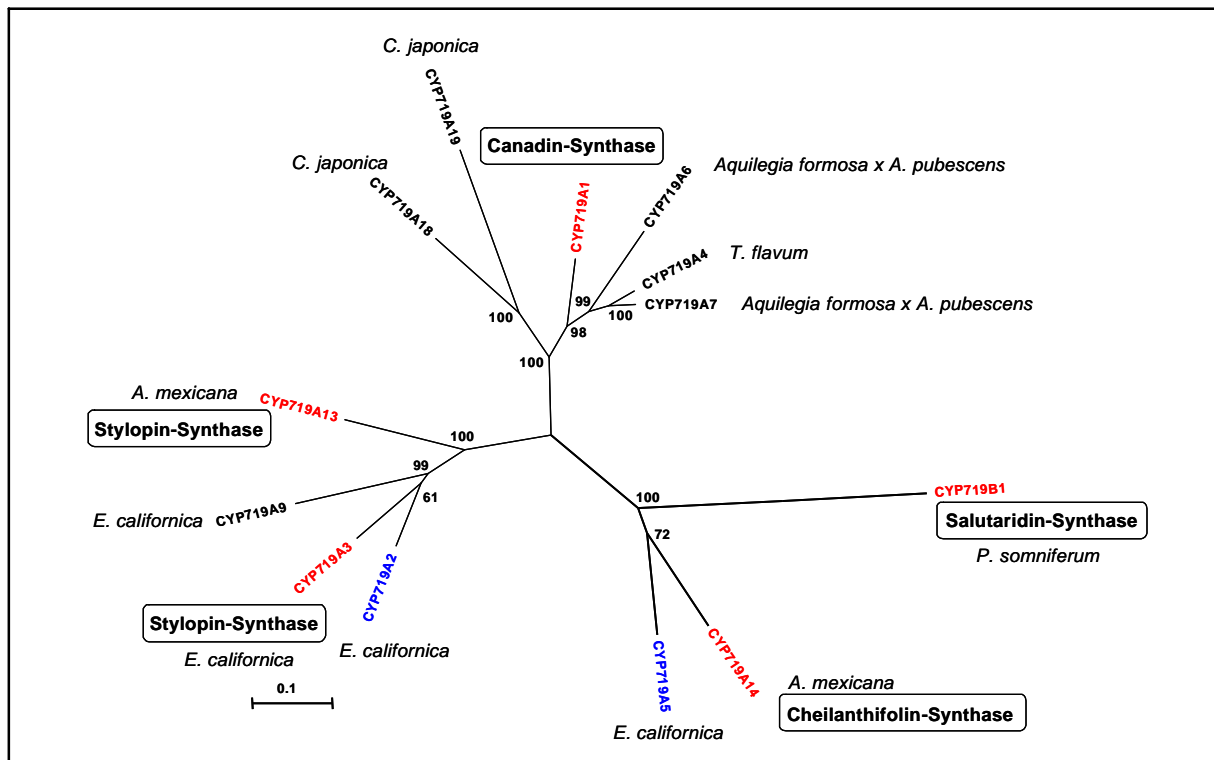


Abb. 4.1: Neighbor-joining Dendrogramm der CYP719A-Proteine. In roter Schrift sind Enzyme mit experimentell verifizierter Enzymaktivität gekennzeichnet. In blau sind die in dieser Arbeit identifizierten Proteine markiert. Die Längen der Verzweigungen entsprechen der Divergenz entsprechend dem Maßstabsbalken (0,1 entspricht 10 % Austausch). Die *bootstrap values* basieren auf einhundert Wiederholungen und sind an den Verzweigungspunkten als Zahlen angegeben.

Im Zuge der EST-Sequenzierung wurden auch drei neue Cytochrom-P450-Enzyme der CYP82-Familie identifiziert und als CYP82N1, CYP82N2 und CYP82P1 annotiert (s. a. **Tab. 4.2**). Alle drei Transkripte werden in Suspensionszellkulturen durch den Hefeelicitor und MeJA stark induziert, zeigen jedoch ein von den biosynthetischen Enzymen der Alkaloidsynthese abweichendes Expressionsprofil. So beginnt die Transkriptakkumulation bereits eine Stunde nach Elicitierung und zeigt einen biphasischen Verlauf, während das Transkript von CYP80B1 erst nach vier Stunden deutlich induziert ist (siehe Abb. 3.8). Es ist daher unwahrscheinlich, dass CYP82N1, CYP82N2 und CYP82P1 Enzyme der Alkaloidbiosynthese darstellen. Zusätzlich konnte für CYP82B1 aus *E. californica* keine Beteiligung an der Alkaloidbiosynthese nachgewiesen werden (Pauli & Kutchan, 1998). Interessanterweise wurden bisher alle Mitglieder der CYP82-Familie als stark Stress-induziert publiziert, eine Funktion konnte aber bislang nicht zugewiesen werden (Frank *et al.*, 1996; Schopfer & Ebel, 1998; Ralston *et al.*, 2001) Einzig für CYP82E4 aus *N. tabacum* wurde eine

Funktion als Nikotin-Demethylase beschrieben (Siminszky *et al.*, 2005). Es ist daher fraglich, ob Enzyme der CYP82-Familie am Benzylochinolinalkaloidstoffwechsel beteiligt sind.

Mit dem Namen CYP80G2 wurde vor kurzem die Corytuberin-Synthase aus *C. japonica* publiziert (Ikezawa *et al.*, 2008). Diese katalysiert, ausgehend von (*S*)-Retikulin, die intramolekulare C-C-Phenolkupplung der Magnoflorin- (Aporphin-) Biosynthese und zeigt Ähnlichkeit zu CYP80A1 aus *B. stolonifera* (Kraus & Kutchan, 1995), welches durch intermolekulare C-O-Phenolkupplung von (*S*)-*N*-Methylcoclaurin und (*R*)-*N*-Methylcoclaurin das Bisbenzylochinolinalkaloid Berbamunin erzeugt. Die Cytochrom-P450-Enzyme CYP81Q1 und CYP81Q2 aus *Sesamum indicum* katalysieren erstaunlicherweise die Ausbildung zweier Methylenedioxybrücken in der Biosynthese des Lignans Sesamin (Ono *et al.*, 2006), wie sie von den Enzymen der CYP719-Familie bekannt sind.

Tab. 2: Einige Mitglieder der CYP80- CYP81- und CYP82-Familien aus verschiedenen Spezies und ihre Funktion. Nomenklatur und Daten nach Dr. D. Nelson, University of Tennessee, Memphis, USA (<http://drnelson.utmem.edu/biblioD.html>). ¹⁾ Enzymaktivität wurde nicht bestimmt.

Name laut Nomenklatur	Funktion	Spezies	Referenz
CYP80A1	Berbamunin-Synthase	<i>B. stolonifera</i>	Kraus & Kutchan, 1995
CYP80B1 (v1 und v2)	<i>N</i> -Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase	<i>E. californica</i>	Pauli & Kutchan, 1998
CYP80B2	<i>N</i> -Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase ¹⁾	<i>C. japonica</i>	Ikezawa <i>et al.</i> , 2003
CYP80B3	<i>N</i> -Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase	<i>P. somniferum</i>	Huang & Kutchan, 2000
CYP80B4	<i>N</i> -Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase ¹⁾	<i>T. flavum</i>	Samanani <i>et al.</i> , 2005
CYP80F1	Littorin-Umlagerung Hyoscyamin-Biosynthese	<i>H. niger</i>	Li <i>et al.</i> , 2006
CYP80G2	Corytuberin-Synthase	<i>C. japonica</i>	Ikezawa <i>et al.</i> , 2008
CYP81Q1 und CYP81Q2	Piperitol- / Sesamin-Synthase	<i>S. indicum</i>	Ono <i>et al.</i> , 2006
CYP82A1 CYP82A2 CYP82A4	unbekannt	<i>G. max</i>	Frank <i>et al.</i> , 1996 Schopfer & Ebel, 1998
CYP82B1	unbekannt	<i>E. californica</i>	Pauli & Kutchan, 1998
CYP82E1	unbekannt	<i>N. tabacum</i>	Ralston <i>et al.</i> , 2001
CYP82E4	Nikotin-Demethylase	<i>N. tabacum</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 2005
CYP82N1	unbekannt	<i>E. californica</i>	diese Arbeit
CYP82N2	unbekannt	<i>E. californica</i>	diese Arbeit
CYP82P1	unbekannt	<i>E. californica</i>	diese Arbeit
CYP82R1	unbekannt	<i>C. japonica</i>	Ikezawa & Sato, unveröffentlicht

Für die Cytochrom-P450-Reduktase (CPR), welche die für die katalytische Aktivität der meisten P450-Enzyme nötigen Elektronen liefert, wurden zwei identische ESTs identifiziert. Die CPR zeigte in den Genexpressionsanalysen eine konstitutive Expression in den Ethanolkontrollen und nur eine leichte Induktion der Transkription durch MeJA und den Hefeelicitor (siehe Abb. 3.8). Dies stimmt mit zuvor publizierten Daten zur CPR-Expression überein (Haider *et al.*, 1997; Pauli & Kutchan, 1998). Es wird aber davon ausgegangen, dass in höheren Pflanzen zwei Isoformen der CPR existieren, von denen eine konstitutiv exprimiert wird und die Transkription der zweiten Stress-induzierbar ist (Ro *et al.*, 2002). Die Existenz von zwei CPR-Isoformen in *E. californica* und *P. somniferum* wurde auch aufgrund von Southern-Hybridisierungsdaten vermutet (Rosco *et al.*, 1997). Vielleicht wurde die induzierbare Isoform der CPR in *E. californica* noch nicht identifiziert.

Das Fehlen von ESTs für die erwarteten BBE und CYP80B1 ist wahrscheinlich auf den begrenzten Umfang des EST-Projektes zurückzuführen. Allerdings wurde in größeren EST-Projekten wie dem FGP (9.079 Sequenzen) und einem *Papaver* EST-Projekt (10.224 Sequenzen) auch kein EST für das BBE bzw. für die CPR gefunden (Carlson *et al.*, 2006; Zulak *et al.*, 2007). Vermutlich sind die absoluten Transkriptmengen des BBE in jungen Blütenknospen von *E. californica* und der CPR in elicitierten *Papaver* Suspensionskulturzellen nicht sehr groß. Die Größe eines EST-Projekts ist damit keine Garantie für die Präsenz aller erwarteten cDNAs, die eher vom verwendeten Gewebe und dem Zeitpunkt der Probennahme abhängt.

Insgesamt zeigt sich, dass die Verwendung einer elicitierten Suspensionszellkultur zur Sequenzierung von ESTs eine effiziente Strategie zur Isolierung neuer cDNAs von biosynthetischen Enzymen darstellt. Durch die Induktion der Transkription sind die interessanten cDNAs in der Bibliothek stark angereichert und mit einer relativ kleinen Anzahl an Sequenzierungsreaktionen konnten (putative) cDNAs für fünf von sieben Reaktionsschritten in der Biosynthese vom (*S*)-Norcoclaurin zum (*S*)-Stylopin identifiziert werden. Mit Ausnahme der TNMT (Liscombe & Facchini, 2007) sind noch keine cDNAs für Enzyme der späteren enzymatischen Reaktionen, zum Sanguinarin und Macarpin aus anderen Benzylisochinolinalkaloid-produzierenden Pflanzenspezies bekannt. Ein möglicher methodischer Ansatz zur Selektion von Kandidaten, die hinsichtlich bislang unbekannter Funktionen charakterisiert werden können, bietet die globale Genexpressionsanalyse zur Identifikation induzierter und co-regulierter Gene. Durch einen solchen Ansatz gelang auch die Klonierung der cDNA für die Salutaridin-Reduktase (Ziegler *et al.*, 2006) und der Salutaridin-Synthase (Gesell, 2008) aus *P. somniferum*.

4.2 Genexpressionsanalysen zeigen eine koordinative Induktion der Alkaloidbiosyntheseenzyme

Nach der EST-Sequenzierung wurden die nicht-redundanten cDNAs verwendet, um cDNA-Macroarrays zur Genexpressionsanalyse herzustellen. Macroarrays unterscheiden sich von den Microarrays hauptsächlich in der Art des Trägermaterials, auf den die Nukleinsäuren aufgebracht werden, und in der Dichte und damit der Anzahl der Elemente. Macroarrays werden auch als *Reverse Northern* bezeichnet. Statt einer Hybridisierung einer unbekanntes Transkriptmenge mit einer bekannten Sonde werden nunmehr bekannte cDNAs mit unbekanntes Sonden, den mRNAs einer Probe, hybridisiert, um aus den Signalen zu schließen welches Transkript wie stark exprimiert wird. Die Entwicklung der Macroarrays reicht zurück vom *Screening* von cDNA-Bibliotheken auf Filtermembranen und deren Systematisierung zu so genannten *gridded libraries*, bei denen jeder Klon seine definierte Anordnung (Array) auf der Filtermembran hat. Die Verwendung von speziell behandelten Glassoberflächen zur Herstellung der Microarrays lässt eine der größere Dichte der einzelnen Elemente zu und ermöglicht Arrays mit über 10.000 cDNA-Elementen, die auf einem Objektträger Platz finden (Brown & Botstein, 1999). Die Herstellung der Microarrays ist allerdings technisch aufwendiger, als das Bedrucken von Nylonmembranen zur Fertigung von Macroarrays. Macroarrays haben sich in ihrer Anwendung als zuverlässige und robuste Methode erwiesen und sind zudem noch preisgünstiger. Microarrays werden oft auch für das Aufbringen von kurzen, sehr sequenzspezifischen Oligonukleotiden verwendet und machen damit eine Differenzierung der Genexpression von verwandten Genen wie z.B. von Enzymfamilien möglich (Hughes *et al.*, 2001; Kreil *et al.*, 2006). Dabei müssen jedoch für jedes zu untersuchende Gen mehrere Oligonukleotide und sogenannte *Mismatch*-Oligonukleotide aufgedruckt werden, was die Gesamtanzahl der analysierbaren Gene wiederum reduziert. Die in dieser Arbeit verwendeten Macroarrays benötigen ca. 80-85 % Sequenzunterschied zur Detektion von differenzieller Genexpression und erlauben damit nicht die Unterscheidung von Isoenzymen. Seit der ersten Publikation der Array-Technik (Gress *et al.*, 1992) belegen mehrere Veröffentlichungen den erfolgreichen Einsatz von cDNA-Macroarrays für Genexpressionsstudien in Pflanzen (Desprez *et al.*, 1998; Aharoni *et al.*, 2000; Goossens *et al.*, 2003; Ziegler *et al.*, 2005 und 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen zeigten, dass die Elicitierung mit dem Hefeelicitor und die Applikation von MeJA eine koordinative Genexpression der biosynthetischen Gene des Alkaloidstoffwechsels in den Suspensionszellkulturen von *E. californica* bewirken. Die zur Kontrolle durchgeführten Northern-Hybridisierungen (siehe

Abb. 3.8) bestätigten die transkriptionelle Aktivierung sämtlicher Enzyme der Biosynthese. Diese Koexpression der biosynthetischen Gene im Isochinolinalkaloidstoffwechsel wurde auch in *C. japonica* und in elicitierten Suspensionskulturzellen von *P. somniferum* beobachtet (Ikezawa *et al.*, 2003; Zulak *et al.*, 2007). Die Transkripte der biosynthetischen Enzyme der Terpenindolalkaloidsynthese in *C. roseus* zeigen ebenfalls eine koordinative Induktion nach MeJA-Behandlung (van der Fits & Memelink, 2000; Collu *et al.*, 2001). In *A. thaliana* wurde durch die Auswertung von Microarray-Genexpressionsdaten die transkriptionelle Koregulation der Enzyme des Shikimat-, des Indol-, des Phenylpropanoid- und des Flavonoidstoffwechsels beobachtet (Gachon *et al.*, 2005)

Diese koordinierte Expression der Gene eines Stoffwechselweges macht vor allem Sinn, wenn sie zur Bildung von Multi-Enzym-Komplexen, sogenannten Metabolons dient (Winkel, 2004). Die Ausbildung eines Metabolons hat viele Vorteile (s. a. Jørgensen *et al.*, 2005): Es erhöht die katalytische Effizienz der Enzyme, indem Intermediate direkt von einem aktiven Zentrum an das aktive Zentrum des folgenden Enzyms weitergereicht werden können. Außerdem verhindert es durch Sequestration die freie Diffusion von Intermediaten und die damit verbundene Verdünnung der Substratkonzentration und stellt die rasche Umsetzung von instabilen oder toxischen Zwischenstufen sicher. Die Existenz von Metabolomen wurde inzwischen für mehrere Stoffwechselwege u.a. für Flavonoide (Burbulis & Winkel-Shirley, 1999; He & Dixon, 2000; Achnine *et al.*, 2004), Polyamine (Panicot *et al.*, 2002) und Alkaloide (Park *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2004) postuliert. Ebenso konnte durch das *Yeast-Two-Hybrid*-System gezeigt werden, dass die SalAT und die SalR der Morphinbiosynthese in *P. somniferum* miteinander interagieren (Sabarna, 2007). Die Unfähigkeit von Zellkulturen bestimmte Naturstoffe wie z. B. Morphin zu synthetisieren könnte auch damit zusammenhängen, dass sich einige Metabolome nur in differenzierten Geweben ausbilden können (Facchini & St-Pierre, 2005). Zudem sind auch oft mehrere Zelltypen an der Synthese und Speicherung bzw. der Sekretion von komplexen Metaboliten beteiligt, was wiederum aktive Transportmechanismen für den interzellulären Transport voraussetzt (Kutchan, 2005).

Allerdings gibt es auch Unterschiede in den Expressionsprofilen bei der Verwendung des Hefeelicitors und von MeJA. Während die Transkriptakkumulation bereits vier Stunden nach Elicitierung der Suspensionszellkulturen mit dem Hefeelicitor deutlich wird, beginnt diese erst sechs Stunden nach MeJA-Applikation. Das Maximum an Transkriptmenge wird 12 bis 24 Stunden nach dem Elicitorkontakt erreicht und anschließend nehmen die Mengen an gebildeter mRNA wieder ab. Die Abnahme der Transkriptmengen wird nach Zugabe des MeJA auch bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nach 96 Stunden nicht beobachtet.

Diese unterschiedliche Kinetiken der Expressionsprofile bei der Verwendung von Hefeelicitor und MeJA können wie folgt erklärt werden. Der Hefeelicitor wird von der Zelle durch einen Rezeptor erkannt und gleicht einem Pathogenkontakt am Beginn der Signaltransduktion. Es kommt dann zur transienten Produktion von Jasmonsäure als *second messenger* und zur transkriptionellen Induktion der Genexpression der biosynthetischen Enzyme. Nach der Synthese der Alkaloide beginnt das System wieder zum Zustand vor dem Elicitorkontakt zurückzukehren und die Transkripte werden nicht mehr in diesen großen Mengen benötigt und daher abgebaut. Bei der Zugabe von MeJA zu den Suspensionszellkulturen erfolgt der Eingriff an einer anderen Stelle inmitten der Signaltransduktionskette. Außerdem liegt eine so große äußere Konzentration vor, dass die Zelle ständig in einem aktivierten Zustand verbleibt und deshalb die Transkriptmengen nicht reduziert werden.

Weiterhin zeigten die Untersuchungen zur Genexpression, dass neben den Genen des Sekundärstoffwechsels und insbesondere der Alkaloidbiosynthese auch Gene des Primärstoffwechsels transkriptionell induziert werden. Hierzu gehörten vor allem die Gene der Tyrosinbiosynthese (siehe **Abb. 4.2**) und des SAM-Zyklus (siehe **Abb. 4.3**).

Die Abbildungen 3.4 a und 3.5 zeigen die erhöhte Transkription der Chorismat-Synthase (31D09), der Chorismat-Mutase (31E02) und der Arogenat-Dehydrogenase (31D10). Die gesteigerte Produktion der Aminosäure Tyrosin liefert die nötigen Vorstufen für die Synthese der Benzylisochinolinalkaloide. Auch die vermehrte Bereitstellung von SAM für Methylierungsreaktionen ist für die Alkaloidsynthese förderlich. SAM wird allerdings auch für die Ethylenproduktion und Polyaminsynthese benötigt und ist ein Methylgruppdonor für die DNA- und RNA-Modifikation sowie die Synthese vieler struktureller Komponenten (Lignin, Cholin, Pectin).

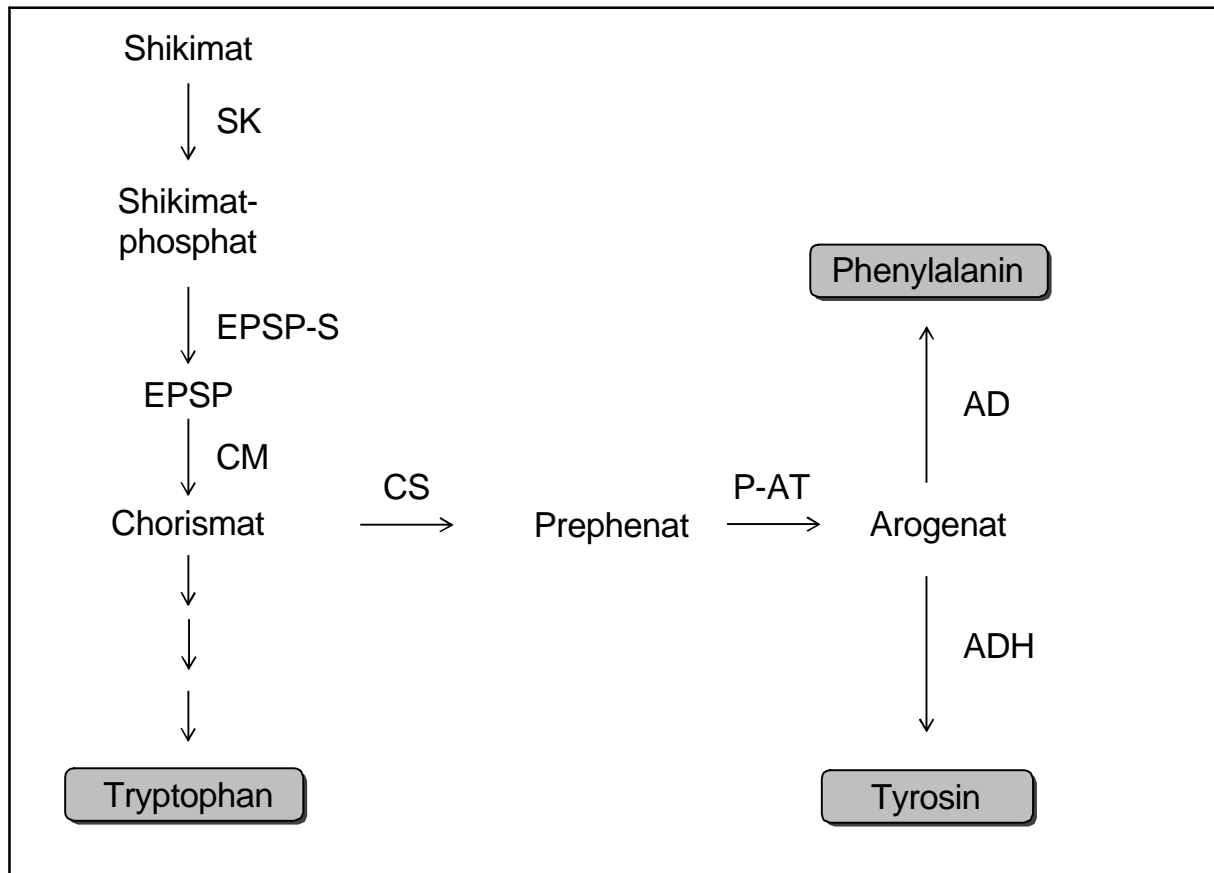


Abb. 4.2: Schema der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan ausgehend von Shikimat. Tryptophan wird in mehreren Reaktionsschritten über Anthranilat gebildet. Der Hauptweg der Synthese von Tyrosin und Phenylalanin geht über Arogenat (Arogenatweg). Ein alternativer Weg (Prephenatweg) führt über Prephenat und Hydroxyphenylpyruvat bzw. Phenylpyruvat (nicht dargestellt). SK: Shikimat-Kinase, EPSP: 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat, EPSP-S: EPSP-Synthase, CS: Chorismat-Synthase, CM: Chorismat-Mutase, P-AT: Prephenat-Aminotransferase, ADH: Arogenat-Dehydrogenase, AD: Arogenat-Dehydratase.

In der Abbildung 3.4 a ist das Transkript der *S*-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase (07E08) als deutlich induziert zu erkennen. Weitere Transkripte der SAM-Synthetase (04C07, 11H09) sowie die Transkripte der Methionin-Synthase (08A07, 08C06) und der *S*-Adenosyl-Homocysteinase (22D12, 26A09) sind ebenfalls induziert (nicht in den Abb. ersichtlich). In mit *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicitierten Suspensionszellkulturen und auch in infiltrierten Ganzpflanzen von Petersilie (*P. crispum*) wurde die Aktivierung des SAM-Zyklus durch transkriptionelle Induktion der *S*-Adenosyl-L-Methionin-Synthetase und der *S*-Adenosyl-Homocysteinase beobachtet (Kawalleck *et al.*, 1992). Transkripte des SAM-Zyklus wurden auch in den ESTs aus *C. roseus* Zellkulturen, sekretorischen Drüsenzellen von Basilikum und Blütenblättern der Rose identifiziert (Rischer *et al.*, 2006; Gang *et al.*, 2001; Guterman *et al.*, 2002).

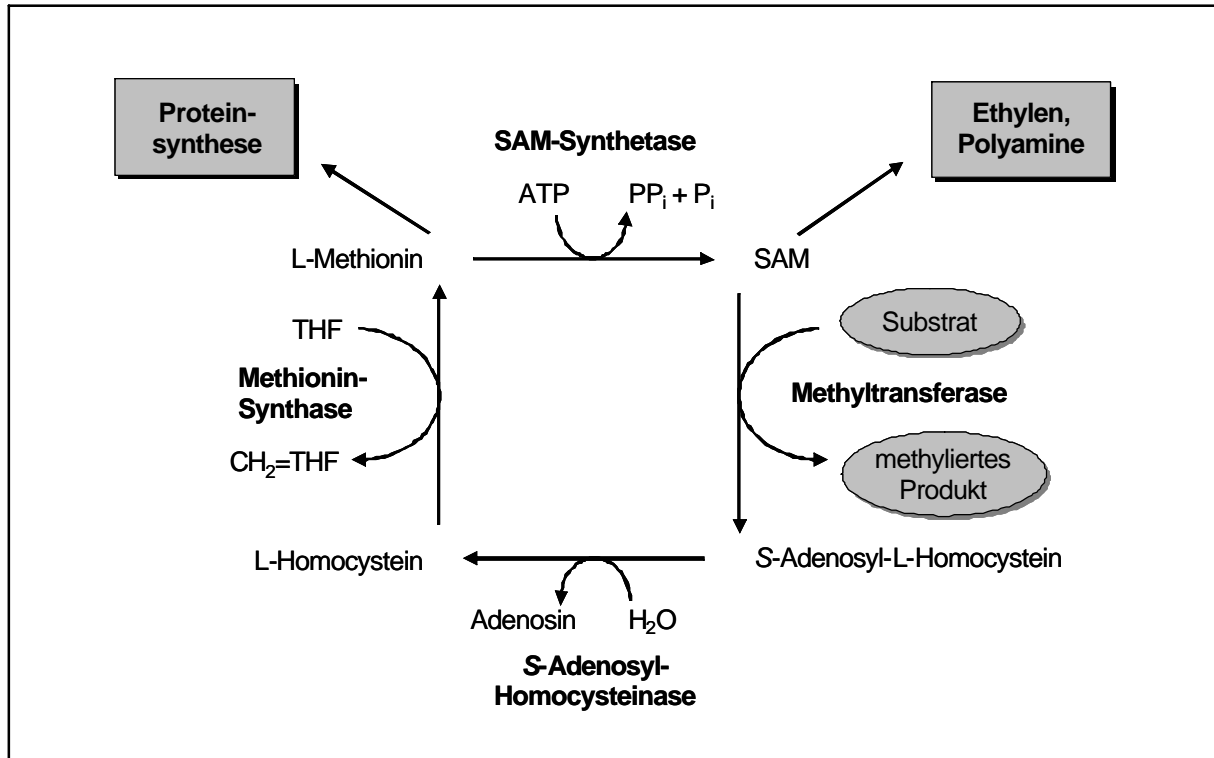


Abb. 4.3: Der SAM-Zyklus. Etwa 20 % des Methionins wird für die Proteinsynthese benötigt, der Rest wird in SAM umgewandelt und steht als Methylgruppendonor für Methylierungsreaktionen zur Verfügung. Der Verbrauch von SAM ist mit dem Recycling des Homocysteinylrestes und Regeneration von Methionin gekoppelt. SAM: S-Adenosyl-L-Methionin, THF: Tetrahydrofolat

Für die gleichzeitige Induktion von Teilen des Primärstoffwechsels, die den Verbrauch von Substraten der Naturstoffbiosynthese ausgleichen gibt es weitere Belege. In Suspensionskulturzellen von *P. crispum* bewirkt UV-Licht die gleichzeitige Genexpression des Flavonoidstoffwechsels und Primärstoffwechselwegen, welche die Flavonoidbiosynthese mit Substraten beliefern (Logemann, 2000). Genexpressionsanalysen in elicitierten Suspensionskulturzellen von *P. somniferum* zeigten ebenfalls die Induktion von Primärstoffwechselwegen, wie dem Zuckerkatabolismus, dem Shikimatstoffwechsel, dem Metabolismus von aromatischen Aminosäuren und dem SAM-Zyklus (Zulak *et al.*, 2007). Neben der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidbiosynthese wurde in den Suspensionskulturzellen von *P. somniferum* auch der Phenylpropanstoffwechsel induziert. Diese Beobachtung wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit ebenfalls gemacht. In den Abbildungen 3.4 a und 3.5 ist ersichtlich, dass die Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) CYP75B2 (29G09, 30A05), die *p*-Coumaryl-Shikimat-3'-Hydroxylase (CS3'H) CYP98A2 und die Cinnamat-4-Hydroxylase (C4H) CYP73 (30C10) transkriptionell induziert werden. Auch die Expression der Hexokinase (02C09, 10G07) wird in *E. californica* Suspensionskulturzellen durch MeJA

induziert. In Suspensionszellkulturen von *C. roseus* wird durch Überexpression des Jasmonat-responsiven ORCA3 Transkriptionsfaktors auch die Expression der Anthranilat-Synthase (AS α) und der 1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) aktiviert, die an der Synthese von Tryptamin und Secologanin beteiligt sind (van der Fits & Memelink, 2000).

Es ist demnach ersichtlich, dass die Produktion von Sekundärstoffen einen maßgeblichen Einfluss auf den Primärstoffwechsel nach sich zieht, was sich durch einen erhöhten Bedarf an Biosynthese, an Kofaktoren und möglicherweise an Energie erklären lässt.

4.3 *In silico* Analyse der Promotoren von Genen der Alkaloidbiosynthese

Das Vorhandensein eines *cis*-Elements in einer Promotorsequenz und dessen Ermittlung durch computergestützte Analyse sollte immer mit einer gewissen Vorsicht interpretiert werden, da das zufällige Vorkommen von relativ kurzen konservierten Motiven in mehreren hundert Basenpaar langen Sequenzen auch rein statistisch erwartet werden kann. Dennoch erlauben diese Untersuchungen gewisse Vorhersagen über die Bindung und Regulation durch bestimmte Transkriptionsfaktoren und liefern Ansätze für die experimentellen Überprüfungen.

Die Untersuchung des **BBE-Promotors** auf *cis*-regulatorische Elemente, die eine Rolle bei der Stress-induzierten Genexpression spielen könnten, ergab das Vorhandensein einer GCC-Box an der Position -108 bis -101 stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes. Diese GCC-Box wurde schon von K. Hauschild als *cis*-regulatorisches Element erkannt (Hauschild, 1995), aber als AGC-Box (Hart *et al.*, 1993) bezeichnet. Erst später wurde dieses Element als Ethylen-responsives Element im Promotor der PR-Gene und als Bindungsmotiv der ERF-Transkriptionsfaktoren beschrieben (Sessa *et al.*, 1995; Shinshi *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1996; Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). Die GCC-Box (AGCCGCC) besitzt große Ähnlichkeit mit dem JERE-Motiv (AGACCGCC) im Promotor der Strictosidin-Synthase aus *C. roseus* (s. a. Abb. 3.14). Das JERE ist die Bindungssequenz für die beiden ERF-Transkriptionsfaktoren ORCA2 und ORCA3, welche an der Jasmonat- und Elicitor-induzierten Genexpression der Strictosidin-Synthase beteiligt sind (Menke *et al.*, 1999 b; van der Fits & Memelink, 2001). Direkt neben der GCC-Box im BBE-Promotor liegt eine G-Box und etwas weiter stromabwärts befinden sich eine weitere G-Box und eine T-Box. Sie enthalten das palindrome ACGT-Element und werden von bZIP-Transkriptionsfaktoren erkannt. G-Boxen sind in der MeJA-vermittelten Induktion des vegetativen Speicherproteins der Sojabohne und des Proteinase II-Inhibitors der Kartoffel beteiligt (Mason *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1992). Die

auffällige Häufung von W-Boxen in der Promotorregion des Berberinbrückenenzym könnte auch auf eine Regulation durch WRKY-Transkriptionsfaktoren deuten. In *C. japonica* wurde der WRKY-Transkriptionsfaktor CjWRKY1 als Regulator der Berberinbiosynthese beschrieben (Kato *et al.*, 2007). Transiente RNAinterference Versuche mit CjWRKY1 zeigten die reduzierte Expression vieler Enzyme der Berberinbiosynthese (TYDC, NCS, 6-OMT, CNMT, CYP80B2, 4'-OMT, BBE, SMT und CYP719A1) in Suspensionszellkulturen. Die ektopische Expression von CjWRKY1 resultierte in der transkriptionellen Aktivierung derselben Alkaloidbiosynthesegene, nicht aber von Genen der Tyrosinbiosynthese. Im Promotor von CYP80B2 wurde eine W-Box identifiziert, welche als Bindungsmotiv für CjWRKY1 postuliert wird, jedoch wird keine direkte Bindung z.B. durch EMSAs gezeigt. CjWRKY1 wird in den Suspensionskulturzellen von *C. japonica* konstitutiv exprimiert und ist daher wohl nur an der basalen aber nicht an der elicitierten Alkaloidbiosynthese beteiligt.

Durch Transaktivationsversuche mit den Promotoren des Berberinbrückenenzym und von CYP82B1 (fälschlicherweise als (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase angenommen) wurde der Transkriptionsfaktor WRKY1 aus *A. thaliana* als Regulator der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* Suspensionskulturzellen identifiziert (Apuya *et al.*, 2008).

Die Expression des BBE aus *P. somniferum* ist ebenfalls durch MeJA und eine *Botrytis*-Elicitorpräparation induzierbar (Facchini *et al.*, 1996 b). Die Analyse des Promotors auf *cis*-regulatorische Elemente ergab das Vorhandensein eines DRE/CRT-Kernmotivs (ACCGAC, 1932-1937) und eines CRT/DRE-HV CBF2-Elementes (GTCGAC, 2013-2018). Weiterhin enthält der BBE-Promotor aus *P. somniferum* eine G-Box (CACGTG, 2533-2538), mehrere W-Boxen und RAV1A-Elemente.

Die Größe des isolierten Promotorbereiche der 4'- und der 6-OMT sind mit 260 bzw. 416 bp nicht besonders lang, jedoch befinden sich die meisten *cis*-regulatorischen Elemente oft in einem kleinen Bereich des Promotors nahe dem Transkriptionsstartpunkt (Guilfoyle, 1997). Untersuchungen an 45 zufällig ausgewählten humanen Promotoren ergaben, dass der Bereich von -300 bis -50 bp vor dem Translationsstartpunkt einen verstärkenden Einfluss auf die Transkription hatte, während der Bereich von -1000 bis -500 bp für 55 % der getesteten Gene negativ regulatorische Elemente enthielt (Cooper *et al.*, 2006).

In dem **Promotor der 4'-OMT** befindet sich auf dem nicht-codierenden (*antisense*) Strang an der Position -154 bis -148 eine GCC-Box (AGCCGCC). Diese wäre ein putatives Bindungsmotiv für einen ERF-Transkriptionsfaktor. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern die Orientierung von nicht-palindromen *cis*-regulatorischen Elementen für die Erkennung durch den Transkriptionsfaktor wichtig ist. Ein 61 bp langes Fragment des beta-1,3-Glucanase B

Promotors aus Tabak enthält zwei Kopien der GCC-Box. Für dieses Fragment konnte unabhängig von der Orientierung relativ zum Transkriptionsstart eine verstärkte Transkription in Verbindung mit dem Blumenkohlmosaikvirus 35S *as1*-Element in *N. plumbaginifolia* Protoplasten nachgewiesen werden (Hart *et al.*, 1993). Eine GCC-Box (an der Position -198 bis -193) auf dem nicht-codierenden Strang des *DcPAL3*-Promotors ist wichtig für die Expression von *DcPAL3* und Bindungsstelle für DcERF1 während der Aktivierung der Anthocyanin-Synthese in *Daucus carota* (Kimura *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde im 4'-OMT-Promotor nahe dem Translationsstart ein ERE (*ethylene-responsive element*) mit dem Sequenzmotiv AWTTCAAA (Montgomery *et al.*, 1993; Itzhaki *et al.*, 1994) identifiziert, was eine Regulation durch Ethylen vermuten lässt. In dem untersuchten Promotorbereich wurde keine W-Box und auch keine G-Box gefunden, was aber auch an der geringen Länge liegen kann.

Der untersuchte **Promotorbereich der 6-OMT** enthält eine G-Box und zwei Bindungsstellen für MYB-Transkriptionsfaktoren ((A/T)AACCA). Auf dem nicht-codierenden (*antisense*) Strang wurden drei W-Boxen ((T)TGAC(C/T)) identifiziert.

Generell wäre eine größere Länge des zu untersuchenden Promotors wünschenswert. Dies könnte durch die Verwendung von seltener schneidenden Restriktionsenzymen während der Konstruktion der *Genome Walking*-Bibliotheken erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre das Durchsuchen einer genomischen Bibliothek mit der entsprechenden cDNA des zu isolierenden Promotors als Hybridisierungssonde.

In der Dissertation von K. Kempe wurden die Promotoren der CYP80B3 (3517 bp), der COR (2956 bp), der CPR (2332 bp) und der SalAT (407 bp) aus *P. somniferum* isoliert und auf *cis*-regulatorische Elemente untersucht (Kempe, 2008). Im Promotor der CYP80B3 wurde ein EIRE mit dem Sequenzmotiv TTCGACC (eigentlich eine W-Box) identifiziert. Der Promotor der COR enthält eine W-Box und eine ELI-Box 3 (AATTGGTTT). Der CPR-Promotor besitzt eine W-Box (TTGACC) auf dem nicht-codierenden (*antisense*) Strang, jedoch sehr weit stromaufwärts (bei -2101), was die Bedeutung für transkriptionelle Regulation unwahrscheinlich macht. Im Promotor der SalAT wurden keine *cis*-Elemente gefunden, die mit der Stress-induzierten Genexpression in Verbindung gebracht werden können. Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass die Expression der SalAT in Suspensionskulturzellen von *P. somniferum* nicht durch den *Botrytis*-Elicitor aktiviert wird (Zulak *et al.*, 2007). Die Promotorsequenzen der 4'-OMT 2 (EF432250, 562 bp), der 7-OMT (EF432249, 610 bp) und der SalAT (EF432249, 373 bp) aus *P. somniferum* und der CYP82B1 (EF432247, 850 bp) aus *E. californica* wurden ebenfalls vor kurzem veröffentlicht (Apuya *et al.*, 2008). Der

Promotor der 4'-OMT 2 enthält W-Boxen, mehrere RAV1-Motive, eine E-Box und ein ERE (ATTTCAAA), das die Induktion durch Ethylen vermittelt (Montgomery *et al.*, 1993; Itzhaki *et al.*, 1994). In der Promotorregion der 7-OMT wurden W-Boxen (WRKY), I-Boxen (MYB) und E-Boxen (MYC) identifiziert. Als *cis*-regulatorische Elemente des SalAT-Promotors wurden eine E-Box (MYB/MYC), eine W-Box und ein RAV1-Motiv gefunden. Wahrscheinlich ist diese W-Box verantwortlich für die Transaktivierung durch WRKY1 (Apuya *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse stehen aber im Widerspruch zu der Tatsache, dass die SalAT nicht durch Elicitoren induzierbar ist (Zulak *et al.*, 2007). Für den CYP82B1-Promotor aus *E. californica* ist bekannt, dass er durch MeJA und den Hefeelicitor aktiviert wird. Die Analyse ergab das Vorhandensein von zahlreichen *cis*-Elementen wie W-Boxen, I-Boxen, einer H-Box und Bindungsmotive für MYB-Transkriptionsfaktoren. Eine T/G-Box (AACGTG) wie sie in der durch JA vermittelten Induktion der Genexpression von PIN2 und LAP eine Rolle spielt wurde ebenfalls identifiziert. Sie ist das Bindungsmotiv für die bHLH-Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren JAMYC2 und JAMYC10 (Boter *et al.*, 2004).

Der Promotor von CYP80B2 aus *C. japonica* enthält ebenfalls eine W-Box, welche als Bindungsmotiv für CjWRKY1 postuliert wird (Kato *et al.*, 2007).

Für die Terpenindolalkaloidbiosynthese in *C. roseus* wurden die Promotoren der Cytochrom-P450-Reduktase (CPR, Lopes Cardoso *et al.*, 1997), der Tyrosin-Decarboxylase (TDC, Ouwerkerk & Memelink, 1999), der Strictosidin-Synthase (STR, Pasquali *et al.*, 1999) und der Geraniol-10-Hydroxylase (G10H, Suttipanta *et al.*, 2007) untersucht.

Interessanterweise ist die G10H-Expression durch MeJA induzierbar (Collu *et al.*, 2001), wird aber nicht durch ORCA3 reguliert (van der Fits & Memelink, 2000). Eine transkriptionelle Aktivierung der G10H-Expression durch fungale Elicitoren wurde noch nicht publiziert.

4.4 Transkriptionelle Regulatoren der Alkaloidbiosynthese

Durch die Sequenzierung von ESTs aus einer cDNA-Bibliothek aus elicitierten Suspensionskulturzellen wurden Sequenzen erhalten, die nach Datenbankvergleichen offensichtliche Homologie zu Transkriptionsfaktoren aufzeigten. Mit Hilfe des Vergleiches der Genexpressionsprofile von elicitierten Zellen und nicht-elicitierten Kontrollzellen wurden potentielle Kandidaten selektiert. Die beiden cDNAs 18F08 (EcaERF2) und 13G11 (EcaERF3) zeigten bereits kurz nach Elicitierung der Zellen mit dem Hefeelicitor eine deutliche transiente Transkriptakkumulation (siehe Abb. 3.6 und 3.7). Die Applikation von Methyljasmonat (MeJA) bewirkte einen ähnlichen Effekt. Das Transkript einer cDNA mit

Homologie zu einem WRKY-Transkriptionsfaktor (WRKY31, 06D12) war besonders nach Elicitorzugabe stark und anhaltend induziert. MeJA bewirkte dagegen nur eine schwache Induktion der Expression. Die transkriptionelle Aktivierung von EcaERF2 und EcaERF3 ging der Transkription der biosynthetischen Enzyme voraus. Interessanterweise war die transkriptionelle Induktion von EcaERF2 durch den Hefeelicitor nur sehr kurz, während das Transkript von EcaERF3 bis zu acht Stunden nach der Elicitierung erhöht war. Die Kinetik der Transkriptakkumulation von EcaERF2 und EcaERF3 ist vergleichbar mit der der Transkriptionsfaktoren ORCA2 und ORCA3 aus *C. roseus* nach MeJA-Applikation (Menke *et al.*, 1999 b; van der Fits & Memelink, 2001). Beide cDNA-Klone (und weitere in Tab. 3.4 aufgeführte sequenzidentische cDNAs) wurden vollständig sequenziert und zeigten eindeutige Zugehörigkeit zur Familie der AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren. Für EcaERF2 konnte der gesamte codierende offene Leserahmen der cDNA sequenziert ermittelt werden. Die beiden cDNA-Klone für EcaERF3 waren jedoch unvollständig. Versuche den fehlenden Bereich mittels 5'-RACE-PCR zu generieren waren nicht erfolgreich. Vermutlich verhindern starke Sekundärstrukturen der mRNA die effektive cDNA-Synthese. Ein alternativer Weg die vollständige cDNA-Sequenz zu erhalten wäre die Verwendung des GenomeWalker™ Universal Kits, der auch zur Isolation der Promotorbereiche eingesetzt wurde. Die Volllänge-cDNA EcaERF1 (08G07) zeigte ebenfalls Homologie zu AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren. Jedoch zeigte das Transkript von EcaERF1 eine konstitutive Expression in der Kinetik und konnte nicht durch Elicitierung oder MeJA-Applikation induziert werden (siehe Abb. 3.9). Ein Sequenzvergleich der DNA-Bindungsdomänen mit denen von anderen AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren zeigte die Zugehörigkeit der drei Transkriptionsfaktoren zur ERF-Unterfamilie. In dieser sind in der DNA-Bindungsdomäne an den Positionen 14 und 19 die Aminosäuren Alanin (A) und Asparaginsäure (D) konserviert. In der CBF/DREB-Unterfamilie sind an der Position 14 Valin (V) und an Position 19 Glutaminsäure (E) zu finden (Sakuma *et al.*, 2002). Dementsprechend gehört ORCA1, der durch *Yeast-One-Hybrid*-Versuche mit dem JERE als Köder (*bait*) identifiziert wurde (Menke *et al.*, 1999 b) zur CBF/DREB-Unterfamilie. ORCA1 bindet zwar im EMSA *in vitro* sequenzspezifisch an das JERE im Strictosidin-Synthase-Promotor, lässt sich aber weder durch MeJA noch durch den Hefeelicitor transkriptionell induzieren und zeigt auch nur eine sehr geringe Transaktivierung des STR-Promotors (Menke *et al.*, 1999 b). ORCA2 und ORCA3 gehören dagegen ERF-Unterfamilie. ORCA2 wurde ebenfalls durch *Yeast-One-Hybrid*-Versuche als an das JERE-bindender Transkriptionsfaktor gefunden (Menke *et al.*, 1999 b). ORCA3 bindet ebenfalls an das JERE (van der Fits & Memelink, 2001), wurde aber durch Transfer-DNA-Aktivierungs-

Tagging (T-DNA *activation tagging*) in Suspensionskulturzellen von *C. roseus* identifiziert (van der Fits & Memelink, 2000). Durch transiente Überexpression von ORCA3 konnte die Expression zahlreicher Enzyme der Terpenindolalkaloidbiosynthese aktiviert werden. In den transgenen Zellkulturen waren die Transkripte der Tryptophan-Decarboxylase (TDC), der Cytochrom-P450-Reduktase (CPR), der Secologanin-Synthase (SLS) und der Strictosidin-Synthase (STR) stark erhöht. Auf dem Weg zum Vindolin zeigte die Desacetoxyvindolin-4-Hydroxylase (D4H) ebenfalls eine verstärkte Transkription. Die Expression der zum Primärstoffwechsel zählenden und an der Synthese von Tryptamin und Secologanin beteiligten Enzyme Anthranilat-Synthase (ASa) und 1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) war auch aktiviert. Die Expression der Geraniol-10-Hydroxylase (G10H) und der Acetyl-CoA: 4-*O*-Deacetylvindolin-4-*O*-Acetyltransferase (DAT) waren dagegen nicht induziert, was auf eine andersartige Regulation dieser Enzyme deutet.

MeJA bewirkt die schnelle und transiente Transkription von ORCA2 und ORCA3, die der Expression ihrer Zielgene *TDC* und *STR* voraus geht (Menke *et al.*, 1999 b; van der Fits & Memelink, 2001). Genexpressionsversuche in Gegenwart des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid, zeigten jedoch die Cycloheximid-insensitive Induktion der *STR* und der *TDC* durch MeJA (van der Fits & Memelink, 2001). Zuvor wurde gezeigt, dass die Induktion der *STR* durch JA sensitiv gegenüber Proteinkinase-Inhibitoren ist (Menke *et al.*, 1999 a). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass nicht die *de novo* Synthese von ORCA-Transkriptionsfaktoren, sondern eher die Aktivierung von vorhandenen Proteinen, z.B. durch Phosphorylierung, die transkriptionelle Induktion der Biosynthesegene auslöst.

Die weitere Sequenzanalyse der Aminosäuresequenz von EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 ergab N-terminal der DNA-Bindungsdomäne von EcaERF1 und EcaERF3 sowie C-terminal der DNA-Bindungsdomäne in EcaERF2 das Vorhandensein einiger basischer Aminosäuren, die ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) darstellen. Bereiche mit vielen sauren Aminosäuren, die zudem viele Serinreste aufweisen befinden sich in allen drei Proteinsequenzen N-terminal der ERF-Domäne und in EcaERF3 auch C-terminal von dieser. Dabei könnte es sich um potentielle Aktivierungsdomänen handeln. In keinem der drei Proteine konnte in der weiteren Sequenz ein EAR-Motiv gefunden werden, das in transkriptionellen Repressoren für die aktive Repression verantwortlich ist (Ohta *et al.*, 2001). Deshalb kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den drei *Eschscholzia*-ERF-Transkriptionsfaktoren um Aktivatoren der Transkription handelt. In allen drei Proteinsequenzen wurden auch potentielle Phosphorylierungsstellen für Serin-/Threonin-Kinasen sowie in EcaERF1 und EcaERF2 Docking-Motive für MAP-Kinasen

identifiziert. Es gibt einige Veröffentlichungen, in denen eine verstärkte DNA-Bindung nach Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors beschrieben wird: Die Phosphorylierung von Pti4 durch die Pto-Kinase verstärkt die Bindung von Pti4 an die GCC-Box und die PR-Genexpression in Tomate (Gu *et al.*, 2000). Ebenso wird OsEREBP1 in Reis durch die im Nukleus lokalisierte Mitogen-aktivierte Protein Kinase BWMK1 phosphoryliert und dessen Bindung an die GCC-Box in mehreren PR-Gen-Promotoren verstärkt (Cheong *et al.*, 2003). Die Aktivität des bZIP-Transkriptionsfaktors AREB1 in *A. thaliana* wird durch ABA-abhängige Phosphorylierung durch eine Serin-/Threonin-Kinase an drei Stellen des Proteins reguliert (Furhata *et al.*, 2006). Interessanterweise wird die Transkription einer cDNA (16H01) mit Homologie zu CHRK1, einer neuen mit Chitinasen verwandten Rezeptor-ähnlichen Kinase aus *N. tabacum* (Kim *et al.*, 2000), in Suspensionskulturzellen von *E. californica* nach Hefeelictorzugabe stark induziert. Die Elicitor-induzierte GCC-Box vermittelte Expression von ERF2 in Tabak wird ebenfalls durch Phosphorylierung und Desphosphorylierung reguliert (Yamamoto *et al.*, 1999). Am C-terminalen Ende von AtERF5 wurde ebenfalls eine konservierte Phosphorylierungsstelle (PxxSPxSP) für MAP-Kinasen identifiziert (Fujimoto *et al.*, 2000).

Um DNA-Bindungsstudien durchführen zu können, wurde die DNA-Bindungsdomäne von EcaERF2 heterolog in *E. coli* Zellen exprimiert und das Protein durch Affinitätschromatographie gereinigt. Publikationen anderer Arbeitsgruppen hatten zuvor gezeigt, dass es ausreicht die DNA-Bindungsdomäne mit zehn Aminosäuren vor und acht Aminosäuren hinter dieser anstelle des gesamten Proteins für DNA-Bindungsstudien zu verwenden (Hao *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2002). Die Expression löslichen Proteins gelang erst durch Verwendung des Vektors pET41 und des Expressionsstammes Rosetta 2 (DE3) bei niedrigen Temperaturen. Dieser besitzt auf dem Plasmid pRARE2 die tRNA-Gene für die in *E. coli* selten verwendeten Codons (Novy *et al.*, 2001 und 2003). Durch die Klonierung in den pET41-Vektor entsteht ein Fusionsprotein mit GST, das die Löslichkeit des exprimierten Proteins verbessert (Esposito & Chatterjee, 2006).

Die *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) zeigten eine spezifische und hochaffine Bindung der DNA-Bindungsdomäne von EcaERF2 an die GCC-Box (siehe Abb. 3.16). Erst ab einem 100-fachen molaren Überschuss von nicht-markierter Kompetitor-DNA ist die Bindung von ³²P-markiertem GCC-Box-Oligonukleotid nicht mehr ersichtlich. In weiteren Gelshiftassays konnte keine oder nur eine sehr geringe Bindung an Sequenz-ähnliche *cis*-Elemente gezeigt werden (siehe Abb. 3.15). Auch war eine Bindung an die JERE des

Strictosidin-Synthase-Promotors nicht nachzuweisen. Der Austausch des ersten und des zweiten Guanins der GCC-Box zu Thymin (mutGCC-Box, ATCCTCC) führte zu einem kompletten Verlust der Bindung an EcaERF2 im EMSA.

EMSA mit NtERF2, NTERF4 und AtERF1 hatten gezeigt, dass eine minimale Länge von 11 Basenpaaren eines GCC-Box Fragmentes für eine sichere Bindung an die ERF-Domäne ausreicht und dass die beiden Guaninreste und das letzte Cytosin die größte Bindungsspezifität vermitteln (Hao *et al.*, 1998). Der Vergleich der Bindung von AtERF1 bis AtERF5 an mit DNA-Fragmente mit Einzelaustauschen zu Thymin an allen sieben Positionen des GCC-Box Motivs ergab unterschiedliche Sensitivität gegenüber Abweichungen von dem optimalen GCC-Box Motiv für alle fünf Proteine trotz identischer Sequenz der konservierten Aminosäuren (AAEIRD) in dem DNA-bindenden β -Faltblatt 2 (Fujimoto *et al.*, 2000) In CBF/DREB-Proteinen sind die konservierten Aminosäuren Valin (V14) und Glutaminsäure (E19) wichtig für die Bindung an das DRE-Motiv (TACCGAC) und Mutationen am zweiten und dritten Cytosin oder am Guanin verhinderten die Bindung von DREB1A/CBF3 und DREB2A (Sakuma *et al.*, 2002).

Aktuelle Veröffentlichungen zeigen auch die Bindung von ERF-Transkriptionsfaktoren an neuartige, nicht oder nur sehr entfernt mit der GCC-Box und dem DRE verwandte, *cis*-Elemente. Zwei durch Verwundung transkriptionell induzierte ERF-Transkriptionsfaktoren WRAF1 (*wound-responsive AP2/ERF-like factor 1*) und WRAF2 binden an das VWRE (*vascular system-specific and wound-responsive cis-element*) im Promotor des Tabak Peroxidase-Gens *tpoxN1* und aktivieren dessen Expression (Sasaki *et al.*, 2007) Erstaunlicherweise enthält das VWRE (GAAAAGAAAATTTC) keinerlei bekannte Bindungsmotive für ERF-Proteine. Die ERF-Transkriptionsfaktoren ERN1 (*ERNF Required for Nodulation 1*), ERN2 und ERN3 aus *M. truncatula* binden an die NF-Box (GCAGGC) im Promotor des *MtENOD11* (*early nodulin 11*) Gens (Andriankaja *et al.*, 2007). Auch wenn in den Aminosäuresequenzen von ERN1-3 keine typische NLS identifiziert werden konnte, wurde durch N-terminale Fusion mit YFP (*yellow fluorescent protein*) die Kernlokalisierung in *N. benthamiana* nachgewiesen. ERN1 und ERN2 aktivierten die NF-Box vermittelte Reporterexpression, während ERF3 selbst nicht als transkriptioneller Aktivator wirkte und die Transaktivierung von ERN1 und ERN2 reprimierte (Andriankaja *et al.*, 2007). Durch *Yeast One Hybrid Screening* mit der 216 bp langen redox-sensitiven Promotorregion des 2-Cys Peroxiredoxin A (2CPA) Gens aus *Arabidopsis* wurde der ERF-Transkriptionsfaktor RAP2.4a (At1g36060) identifiziert, der an ein CE3 (*coupling element 3*) ähnliches Motiv mit der Sequenz ACGCGATTC bindet (Shaikhali *et al.*, 2008). EMSA mit mutierten Oligo-

nukleotiden zeigten C3 und G4 des CGCG-Kernmotivs als essentiell für die Bindung von RAP2.4a.

Durch die Verwendung eines Oligonukleotids als Probe für die EMSA, welches in der Sequenz genau der GCC-Box und der benachbarten Region im Promotor des Berberinbrückenenzym aus *E. californica* entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass EcaERF2 auch *in vivo* an den BBE-Promotor bindet und dessen Transkription aktiviert. Dafür spricht auch die schnelle und transiente Akkumulation von *EcaERF2*-Transkript nach Elicitierung oder MeJA-Applikation, die der transkriptionellen Aktivierung der biosynthetischen Gene voraus geht.

4.5 Weiterführende Versuche

Obwohl die oben aufgeführten Indizien für eine Beteiligung von EcaERF2 an der Regulation der Alkaloidbiosynthese und insbesondere der transkriptionellen Aktivierung des *BBE1*-Gens sprechen, ist die transkriptionelle Aktivierung der Genexpression noch nicht eindeutig bewiesen. Ein einfacher Versuch zum Test der Transaktivierung wäre durch *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression in Blättern von *N. benthamiana* möglich. Durch Co-Inokulation von *EcaERF2* unter einem konstitutiven Promotor in Kombination mit einem Reporter gen (z.B. GUS oder LUC) unter Kontrolle des BBE-Promotors wäre die Transaktivierung durch Messung der Reporter genaktivität zu bestimmen. Durch Promotordeletionen ließe sich auf diese Weise das für Bindung und transkriptionelle Aktivierung wichtige *cis*-Element verifizieren. Auch die Promotoren weiterer Biosynthesegene ließen sich ebenso auf ihre Aktivierung durch EcaERF2 testen. Ein alternativer Weg wäre die Untersuchung auf Transaktivierung in Hefe z.B. durch Fusion mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne.

Voraussetzung für die Funktion eines eukaryotischen Transkriptionsfaktors ist dessen Lokalisation im Zellkern. Obwohl es auch Ausnahmen gibt, besitzen die meisten Transkriptionsfaktoren ein Kernlokalisierungssignal (NLS) für den aktiven Transport durch die Kernmembran. Zur Untersuchung der Kernlokalisierung von EcaERF2 wäre eine Fusion mit einem fluoreszierenden Protein wie z.B. GFP (*green fluorescent protein*) nützlich. Dieses Fusionsprotein könnte wiederum transient durch Infiltration von *A. tumefaciens* in *N. benthamiana* exprimiert werden. Die Lokalisation wäre dann mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar. Eine weitere Methode zur transienten Expression des GFP-

Fusionsproteins wäre der direkte Gentransfer mittels Partikelbeschuss in das pflanzliche Gewebe wie z.B. Zwiebelepidermiszellen.

Durch Deletion von einzelnen Bereichen oder Domänen des EcaERF2-Proteins ließe sich auch die Funktion des vorhergesagten NLS oder der transkriptionellen Aktivierungsdomäne überprüfen. Umgekehrt sollte das Einfügen eines NES (*nuclear export signal*, Wen *et al.*, 1995) in die Proteinsequenz die Kernlokalisation und damit auch die Transaktivierung verhindern.

Den letztendlich eindeutigsten Beweis für die Beteiligung an der Regulation der Alkaloidbiosynthese würden transgene Suspensionszellkulturen von *E. californica* liefern. Durch Überexpression des Transkriptionsfaktors unter Verwendung eines starken konstitutiven oder eines induzierbaren Promotors würden transgene Zelllinien wahrscheinlich eine erhöhte Menge der Alkaloide produzieren. Diese Zelllinien wären dann sogar durch ihre Rotfärbung selektierbar. Umgekehrt könnten durch Repression der Genexpression mittels antisense- bzw. RNA *interference*-Technologie Zelllinien hergestellt werden, die auch nach Elicitierung nur noch geringe Mengen an Alkaloiden akkumulieren (Park *et al.*, 2002).

Die ektopische Expression von ERF/DREB-Transkriptionsfaktoren ist oft mit der konstitutiven Expression von Genen der Verteidigungsantwort und erhöhter Resistenz gegenüber abiotischen Faktoren und Pathogenen verbunden (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2008), führt aber oft auch zu auffälligen Phänotypen wie Zwergwuchs (TINY, Wilson *et al.*, 1996; OsERF1, Hu *et al.*, 2008).

Die Überexpression von NtERF2 in Tabak aktiviert die Expression von Verteidigungsgenen wie CHN50 und gleichzeitig die des transkriptionellen Repressors NtERF3 (Nakano *et al.*, 2006 b). Diese Ergebnisse zeigen die antagonistische Wechselwirkung zwischen NtERF2 und NtERF3 in der Regulation der Verteidigungsantwort.

Die Herstellung von chimären Repressoren durch Fusion mit dem EAR-Motiv (Hiratsu *et al.*, 2003; Matsui *et al.*, 2005) könnten ebenfalls dazu beitragen, die Funktion von Transkriptionsfaktoren zu klären und die regulierten Zielgene zu untersuchen. In transgenen Zellkulturen, die diesen chimären Repressor konstitutiv exprimieren sollten nach Elicitierung nur diejenigen Gene induziert werden, deren Expression sich nicht auf die Aktivierung durch den mit der Repressordomäne fusionierten Transkriptionsfaktor zurückführen lässt. Durch globale Transkriptionsanalysen und die Subtraktion der Expressionsprofile von nicht transformierten elicitierten Zellkulturen könnten so neue Zielgene für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor identifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Die Biosynthese der Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide ist auf enzymatischer Ebene bereits gut untersucht und zahlreiche cDNAs konnten insbesondere mit Hilfe von Zellkulturen identifiziert werden. Über die Regulation der Alkaloidbiosynthese liegen dagegen erst wenige Erkenntnisse vor. Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit betrifft damit die Regulation der Alkaloidbiosynthese nach Elicitierung in Suspensionszellkulturen von *Eschscholzia californica*. Methodisch wurde ein globaler Ansatz über EST-Sequenzierung mit anschließenden Genexpressionsanalysen mittels Array-Hybridisierung gewählt, der neben der eigentlichen Thematik noch Raum für weitere interessante Befunde zur Benzo[*c*]phenanthridinalkaloidbiosynthese in *E. californica* lies. So wurden durch die EST-Sequenzierung zahlreiche neue cDNAs identifiziert, die Homologie zu bekannten biosynthetischen Enzymen besitzen. Für EcaERF2 einen Transkriptionsfaktor der AP2/ERF-Familie wird die Beteiligung an der transkriptionellen Aktivierung der Biosynthesegene postuliert. Gestützt wird diese Hypothese durch das Expressionsprofil und DNA-Bindungsversuche, die *in vitro* eine Bindung an die im Promotor des Berberinbrückenenzym (BBE) enthaltene GCC-Box zeigten. Zusammenfassend lassen die gewonnen Daten folgende Ergebnisse und Interpretation zu.

1. Es wurde eine EST-Datenbank aus Suspensionszellkulturen von *E. californica* erstellt, die mit einer Elicitorpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefeelicitor) induziert wurden. Durch Sequenzierung von 2598 cDNAs wurden 1956 ESTs erhalten, die sich zu 1140 Unigenes zusammenführen ließen.
2. Die funktionelle Klassifizierung der ESTs zeigte für 60,8 % der Sequenzen homologe Proteine mit bekannter Funktion in den Datenbanken. Die zweitgrößte Kategorie war der Metabolismus mit 21,8 % der Sequenzen. Innerhalb dieser stellte der Alkaloidstoffwechsel mit 22,5 % den größten Anteil des Sekundärstoffwechsels.
3. Insgesamt konnten fünf neue cDNAs (für drei Methyltransferasen und zwei Cytochrom-P450-Enzyme) mit Homologie zu Enzymen der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese identifiziert und vollständig sequenziert werden. Von diesen wurden die 3'-Hydroxy-*N*-Methylcocclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (4'-OMT) und die Norcocclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6-OMT) aus *E. californica* durch heterologe Expression in *E. coli* funktionell charakterisiert (Diplomarbeit von N. Grobe).

4. Zur Herstellung der Macroarrays für Genexpressionsanalysen wurden 1108 cDNAs der EST-Datenbank und auf einem zweiten Array zusätzlich weitere 290 cDNAs aus dem *Floral Genome Project* auf Nylonmembranen angeordnet.
5. Die Genexpressionsprofile nach Elicitierung mit MeJA oder dem Hefeelicitator zeigten die transkriptionelle Induktion einer großen Anzahl von Genen. Neben Genen der allgemeinen Verteidigungsantwort und der Signaltransduktion zeigten insbesondere Gene der Alkaloidbiosynthese eine starke transkriptionelle Induktion. Einige Transkripte des Phenylpropanstoffwechsels und des Primärstoffwechsels (Tyrosinbiosynthese und SAM-Zyklus) waren ebenfalls induziert.
6. Die Gene der Alkaloidbiosynthese zeigten eine auffällige transkriptionelle Co-Regulation nach Elicitierung. Die Kinetiken und die Stärke der Transkriptakkumulation unterschieden sich dabei etwas bei der Verwendung von MeJA und dem Hefeelicitator.
7. Durch Northern-Blot-Hybridisierungen mit allen cDNAs der an der Alkaloidbiosynthese beteiligten Enzyme konnten die durch die Macroarrays erhaltenen Expressionsprofile nach Elicitierung verifiziert werden.
8. Durch vergleichende Genexpressionsanalysen konnten Kandidaten für transkriptionelle Regulatoren der Alkaloidbiosynthese identifiziert werden. Die Zugabe von MeJA oder dem Hefeelicitator resultierte in der schnellen und transienten Induktion der Transkripte von EcaERF2 und EcaERF3, die der Transkriptakkumulation der biosynthetischen Enzyme vorausgeht. Die Expression von EcaERF1 ließ sich dagegen nicht durch Elicitierung oder MeJA induzieren.
9. Die Sequenzanalyse von EcaERF1, EcaERF2 und EcaERF3 ergab, die Zugehörigkeit zur ERF-Gruppe der AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren. In allen drei DNA-Bindungsdomänen sind die konservierten Aminosäuren Alanin und Asparaginsäure an Position 14 und 19 vorhanden. Das für transkriptionelle Repressoren typische EAR-Motiv kommt in keiner der drei Proteine vor. EcaERF1 und EcaERF2 besitzen direkt vor der DNA-Bindungsdomäne eine mögliche Kernlokalisationssequenz aus basischen Aminosäuren. Besonders N-terminal der DNA-Bindungsdomäne befinden sich in allen drei Sequenzen saure, Serin-reiche Bereiche, die als transkriptionale Aktivator-domäne fungieren könnten.
10. Sequenzhomologievergleiche der konservierten DNA-Bindungsdomänen und der gesamten Aminosäuresequenzen führten zu ähnlichen Ergebnissen: EcaERF1 zeigt die größte Ähnlichkeit zu NtCEF1 und JERF1, die ebenfalls beide das N-terminale MCGGAI(I/L)-Motiv der ERF-Untergruppe IV besitzen. EcaERF2 besitzt die höchste

- Homologie zu NtERF4, AtERF5 und LeERF4, während EcaERF3 die größte Ähnlichkeit zu RAP2.6 (At1g43160) aufweist.
11. Mittels PCR-basierter Genomwanderung wurden die Promotorbereiche des BBE, der 4'-OMT und der 6-OMT isoliert und sequenziert. Die *in silicio* Analyse zeigte das Vorhandensein von *cis*-Elementen in allen drei Promotoren, die mit Stress- oder Elicitor-induzierter Genexpression in Verbindung gebracht werden. In der Promotorsequenz des BBE wurden eine GCC-Box, zwei G-Boxen sowie eine große Anzahl von W-Boxen identifiziert.
 12. Die DNA-Bindungsdomäne von EcaERF2 wurde als Fusionsprotein mit GST und Histidin-Tag heterolog in *E coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt.
 13. Durch EMSA konnte die spezifische Bindung der DNA-Bindungsdomäne von EcaERF2 an die GCC-Box (AGCCGCC) gezeigt werden. Die Mutation der GCC-Box (ATCCTCC) führte zu einem kompletten Verlust der Bindung. Ähnliche *cis*-Elemente, wie JERE, DRE und S-Box zeigten keine Bindung an EcaERF2.
 14. Aufgrund der starken und schnellen transkriptionellen Induktion von EcaERF2 (und EcaERF3) durch MeJA und den Hefeelicitor, die *in vitro* Bindung an die GCC-Box und das Vorhandensein dieses *cis*-regulatorischen Elementes im Promotorbereich des BBE, wird eine Beteiligung von EcaERF2 an der Regulation der Stress-induzierten Alkaloidbiosynthese angenommen.
 15. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Ansätze für weiterführende Untersuchungen. EMSA mit EcaERF3 sollten zeigen, ob dieser Transkriptionsfaktor ebenfalls an die GCC-Box des BBE-Promotors bindet. Zur Untersuchung der Kernlokalisation und der Transaktivierung von EcaERF2 wäre die *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression *N. benthamiana* geeignet. Interessant wäre auch die Generierung von transgenen Suspensionskulturzellen von *E. californica*, in denen EcaERF2 konstitutiv exprimiert oder die Expression von EcaERF2 unterdrückt ist. Die parallele Analyse von Metaboliten und Transkripten in diesen Zellkulturen würde eindeutige Erkenntnisse über die Beteiligung von EcaERF2 an der Regulation der Alkaloidbiosynthese und die durch EcaERF2 kontrollierten Gene liefern.

6 Literaturverzeichnis

Achnine L., Blancaflor E.B., Rasmussen S. & Dixon R.A. (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**, 3098-3109.

Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., Dubnick M., Polymeropoulos M.H., Xiao H., Merril C.R., Wu A., Olde B. & Moreno R.F. (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252**, 1651-1656.

Aebersold R. & Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207.

Aerts R.J., Gisi D., De Carolis E., De Luca V. & Baumann T.W. (1984) Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J.* **5**, 635-643.

Aharoni A., Keizer L.C., Bouwmeester H.J., Sun Z., Alvarez-Huerta M., Verhoeven H.A., Blaas J., van Houwelingen A.M., De Vos R.C., van der Voet H., Jansen R.C., Guis M., Mol J., Davis R.W., Schena M., van Tunen A.J. & O'Connell A.P. (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* **12**, 647-662.

Albert V.A., Soltis D.E., Carlson J.E., Farmerie W.G., Wall P.K., Ilut D.C., Solow T.M., Mueller L.A., Landherr L.L., Hu Y., Buzgo M., Kim S., Yoo M.-J., Frohlich M.W., Perl-Treves R., Schlarbaum S.E., Bliss B.J., Zhang X., Tanksley S.D., Oppenheimer D.G., Soltis P.S., Ma H., dePamphilis C.W. & Leebens-Mack J.H. (2005) Floral gene resources from basal angiosperms for comparative genomics research. *BMC Plant Biology* **5**, 5.

Allan A.C., Hellens R.P. & Laing W.A. (2008) MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends Plant Sci.* **13**, 99-102.

Allen M.D., Yamasaki K., Ohme-Takagi M., Tateno M. & Suzuki M. (1998) A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.* **17**, 5484-5496.

Allen R.S., Miller J.A., Chitty J.A., Fist A.J., Gerlach W.L. & Larkin P.J. (2008) Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in opium poppy. *Plant Biotechnol. J.* **6**, 22-30.

Allen R.S., Millgate A.G., Chitty J.A., Thisleton J., Miller J.A.C., Fist A.G., Gerlach W.L. & Larkin P.J. (2004) RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1559-1566.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

Andersen M.D., Busk P.K., Svendsen I. & Møller B.L. (2000) Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin. Cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes. *J. Biol. Chem.* **275**, 1966-1975.

Andriankaja A., Boisson-Dernier A., Frances L., Sauviac L., Jauneau A., Barker D.G. & de Carvalho-Niebel F. (2007) AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent

Mt *ENOD11* activation in root hairs via a novel *cis*-regulatory motif. *Plant Cell* **19**, 2866-2885.

Apuya N.R., Park J.-H., Zhang L., Ahyow M., Davidow P., Van Fleet J., Rarang J.C., Hippley M., Johnson T.W., Yoo H.-D., Trieu A., Krueger S., Wu C.-Y., Lu Y.-P., Flavell R.B. & Bobzin S.C. (2008) Enhancement of alkaloid production in opium and California poppy by transactivation using heterologous regulatory factors. *Plant Biotechnol. J.* **6**, 160-175.

Arakawa H., Clark W.G., Psenak M. & Coscia C.J. (1992) Purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from elicited *Sanguinaria canadensis* cell cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 1-7.

Aukerman M.J. & Sakai H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* **15**, 2730-2741.

Bailey P.C., Martin C., Toledo-Ortiz G., Quail P.H., Huq E., Heim M.A., Jakoby M., Werber M. & Weisshaar B. (2003) Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **15**, 2497-2502.

Baker S.S., Wilhelm K.S. & Thomashow M.F. (1994) The 5'- region of *Arabidopsis thaliana cor15A* has *cis*-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.* **24**, 701-713.

Banno H., Ikeda Y., Niu Q.-W. & Chua N.-H. (2001) Overexpression of *Arabidopsis ESRI* induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* **13**, 2609-2618.

Bauer W. & Zenk M.H. (1989) Formation of both methylenedioxy groups in the alkaloid (*S*)-stylophine is catalyzed by cytochrome P-450 enzymes. *Tetrahedron Lett.* **30**, 5257-5260.

Bauer W. & Zenk M.H. (1991) Two methylenedioxy bridge forming cytochrome P-450 dependent enzymes are involved in (*S*)-stylophine biosynthesis. *Phytochemistry* **30**, 2953-2961.

Bender J. & Fink G.R. (1998) A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5655-5660.

Bilka F., Balazová A., Bilková A. & Psenák M. (2000) Purification of polyphenol oxidase from opium poppy latex. *Pharmazie* **55**, 155-156.

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

Blechert S., Brodschelm W., Hölder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J., Xia Z.Q. & Zenk M.H. (1995) The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4099-4105.

Bonaldo M.D.F., Lennon G. & Soares M.B. (1996) Normalization and subtraction: Two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res.* **6**, 791-806.

Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A. & Lamb C. (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.

Boter M., Ruíz-Rivero O., Abdeen A. & Prat S. (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **18**, 1577-1591.

Boutilier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.-M., van Lammeren A.A.M., Miki B.L.A., Custers J.B.M. & van Lookeren Campagne

- M.M. (2002)** Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* **14**, 1737–1749.
- Bovy A., de Vos R., Kemper M., Schijlen E., Almenar Pertejo M., Muir S., Collins G., Robinson S., Verhoeyen M., Hughes S., Santos-Buelga C. & van Tunen A. (2002)** High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *C1*. *Plant Cell* **14**, 2509-2526.
- Brader G., Tas E. & Palva E.T. (2001)** Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiol.* **126**, 849-860.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Broun P. (2004)** Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 202–209.
- Brouwer J.N., van der Wel H., Francke A. & Henning G.J. (1968)** Miraculin, the sweetness-inducing protein from miracle fruit. *Nature* **220**, 373–374.
- Brown P.O. & Botstein D. (1999)** Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* **21**, 33-37.
- Buchel A.S., Brederode F.T., Bol J.F. & Linthorst HJ. (1999)** Mutation of GT-1 binding sites in the *Pr-1A* promoter influences the level of inducible gene expression *in vivo*. *Plant Mol. Biol.* **40**, 387-396.
- Burbulis I.E. & Winkel-Shirley B. (1999)** Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12929-12934.
- Büttner M. & Singh K.B. (1997)** *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP) and ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interact with an ocs element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5961-5966.
- Canter P.H., Thomas H. & Ernst E. (2005)** Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **23**, 180-185.
- Carlson J.E., Leebens-Mack J.H., Wall P.K., Zahn L.M., Mueller L.A., Landherr L.L., Hu Y., Ilut D.C., Arrington J.M., Choirean S., Becker A., Field D., Tanksley S.D., Ma H. & dePamphilis C.W. (2006)** EST database for early flower development in California poppy (*Eschscholzia californica* Cham., Papaveraceae) tags over 6000 genes from a basal eudicot. *Plant Mol. Biol.* **62**, 351-369.
- Chatel G., Montiel G., Pré M., Memelink J., Thiersault M., Saint-Pierre B., Doireau P. & Gantet P. (2003)** CrMYC1, a *Catharanthus roseus* elicitor- and jasmonate-responsive bHLH transcription factor that binds the G-box element of the strictosidine synthase gene promoter. *J. Exp. Bot.* **54**, 2587-2588.
- Chen G.L., Yang L., Rowe T.C., Halligan B.D., Tewey K.M. & Liu L.F. (1984)** Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* **259**, 13560-13566.
- Chen X. (2004)** A MicroRNA as a Translational Repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* Flower Development. *Science* **303**, 2022-2025.
- Chenchik A., Zhu Y., Diatchenko L., Li R., Hill J. & Siebert P. (1998)** Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In RT-PCR

Methods for Gene Cloning and Analysis. Eds. Siebert P. & Larrick J. (BioTechniques Books, MA), pp. 305-319.

Cheong Y.H., Moon B.C., Kim J.K., Kim C.Y., Kim M.C., Kim I.H., Park C.Y., Kim J.C., Park B.O., Koo S.C., Yoon H.W., Chung W.S., Lim C.O., Lee S.Y., Cho M.J. (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* **132**, 1961-1972.

Choi D.-W., Jung J., Ha Y.I., Park H.-W., In D.S., Chung H.-J. & Liu J.R. (2005) Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. *Plant Cell Rep.* **23**, 557-566.

Choi K.-B., Morishige T., Shitan N., Yazaki K. & Sato F. (2002) Molecular cloning and characterization of coclaurine *N*-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **277**, 830-835.

Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Chou W.-M. & Kutchan T.M. (1998) Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids. *Plant J.* **15**, 289-300.

Chuck G., Meeley R.B. & Hake S. (1998) The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene *indeterminate spikelet1*. *Genes Dev.* **12**, 1145-1154.

Collu G., Unver N., Peltenburg-Looman A.M.G., van der Heijden R., Verpoorte R. & Memelink J. (2001) Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett.* **508**, 215-220.

Cooper S.J., Trinklein N.D., Anton E.D., Nguyen L. & Myers R.M. (2006) Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res.* **16**, 1-10.

Croteau R., Kutchan T.M. & Lewis N.G. (2000) Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (Hrsg.) Buchanan B.B., Grissem W. & Jones R.L.; American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, 1250-1318.

Czarnecka-Verner E., Yuan C.X., Scharf K.D., Englich G. & Gurley W.B. (2000) Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Mol. Biol.* **43**, 459-471.

de Hoon M.J., Imoto S., Nolan J. & Miyano S. (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics* **20**, 1453-1454.

De Luca V., Balsevich J., Tyler R.T., Eilert U., Panchuk B., Kurz W.G.W. (1986) Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* **125**: 147-156.

de Pater S., Greco V., Pham K., Memelink J. & Kijne J. (1996) Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4624-4631.

De Sutter V., Vanderhaeghen R., Tilleman S., Lammertyn F., Vanhoutte I., Karimi M., Inzé D., Goossens A. & Hilson P. (2005) Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells. *Plant J.* **44**, 1065-1076.

De-Eknamkul W., Tanahashi T. & Zenk M.H. (1992) Enzymic 10-hydroxylation and 10-*O*-methylation of dihydrosanguinarine in dihydrochelirubine formation by *Eschscholtzia*. *Phytochemistry* **31**, 2713-2717.

- DeRisi J.L., Iyer V.R. & Brown P.O. (1997)** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686.
- Desprez T., Amselem J., Caboche M. & Hofte H. (1998)** Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.* **14**, 643-652.
- De-Vetten N.C. & Ferl R.J. (1995)** Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J.* **7**, 589-601.
- Diaz-Chávez M.-L. (2009)** Isolation and characterization of (*S*)-cheilantifoline synthase, (*S*)-stylopin synthase and two FAD oxidases from a cDNA library from *Argemone mexicana*. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Dittrich H. & Kutchan T.M. (1991)** Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9969-9973.
- Dombrecht B., Xue G.P., Sprague S.J., Kirkegaard J.A., Ross J.J., Reid J.B., Fitt G.P., Sewelam N., Schenk P.M., Manners J.M. & Kazan K. (2007)** MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2225-2245.
- Donald R.G.K. & Cashmore A.R. (1990)** Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. *EMBO J.* **9**, 1717-1726.
- Dostál J. & Potáček M. (1990)** Quaternary benzo[*c*]phenanthridine alkaloids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **55**, 2840-2873.
- Eilert U. & Constabel F. (1986)** Elicitation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cells by fungal homogenates – an induction process. *J. Plant Physiol.* **125**, 167-172.
- Eilert U., Kurz W.G.W. & Constabel F. (1985)** Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *J. Plant Physiol.* **119**, 65-76.
- Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O. & Botstein D. (1998)** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14863-14868.
- Elliott R.C., Betzner A.S., Huttner E., Oakes M.P., Tucker W.Q.J., Gerentes D., Perez P. & Smyth D.R. (1996)** *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155–168.
- Esposito D. & Chatterjee D.K. (2006)**: Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 353-358.
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S. & Somssich I.E. (2000)** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**, 199-206.
- Eulgem T., Rushton P.J., Schmelzer E., Hahlbrock K. & Somssich I.E. (1999)** Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* **18**, 4689-4699.
- Ewing R.M., Ben Kahla A., Poirot O., Lopez F., Audic S. & Claverie J.M. (1999)** Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res.* **9**, 950-959.
- Facchini P.J. & De Luca V. (1994)** Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *J. Biol. Chem.* **269**, 26684-26690.

- Facchini P.J. & De Luca V. (1995)** Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell* **7**, 1811-1821.
- Facchini P.J. & Park S.-U. (2003)** Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* **64**, 177-186.
- Facchini P.J. & St.-Pierre B. (2005)** Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 657-666.
- Facchini P.J. (2001)** Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **52**, 29-66.
- Facchini P.J., Penzes C., Johnson A.G. & Bull D. (1996 b)** Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiol.* **112**, 1669-1677.
- Faccioli P., Pecchioni N., Cattivelli L., Stanca A.M. & Terzi V. (2001)** Expressed sequence tags from cold-acclimatized barley can identify novel plant genes. *Plant Breeding* **120**, 497-502.
- Färber K., Schumann B., Miersch O. & Roos W. (2003)** Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry* **62**, 491-500.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F. & Whitehouse C.M. (1989)** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R.N. & Willmitzer L. (2000)** Metabolite profiling represents a novel and powerful approach for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* **8**, 1157-1161.
- Finkelstein R.R., Wang M.L., Lynch T.J., Rao S. & Goodman H.M. (1998)** The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* **10**, 1043-1054.
- Foster R., Izawa T., Chua N.-H. (1994)** Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.* **8**, 192-200.
- Frank M.R., Deyneka J.M. & Schuler M.A. (1996)** Cloning of wound-induced cytochrome P450 monooxygenases expressed in pea. *Plant Physiol.* **110**, 1035-1046.
- Frenzel T. & Zenk M.H. (1990 a)** Purification and characterization of three isoforms of *S*-adenosyl-L-methionine: (*R,S*)-tetrahydrobenzylisoquinoline-*N*-methyltransferase from *Berberis koetianeana* cell cultures. *Phytochemistry* **29**, 3491-3497.
- Frenzel T. & Zenk M.H. (1990 b)** *S*-adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-*N*-methyl-(*S*)-coclaurine-4'-*O*-methyltransferase, a regioselective and stereoselective enzyme of the (*S*)-reticuline pathway. *Phytochemistry* **29**, 3505-3511.
- Frick S. & Kutchan T.M. (1999)** Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.* **17**, 329-339.
- Frick S., Chitty J.A., Kramell R., Schmidt J., Larkin P.J. & Kutchan T.M. (2004)** Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with antisense berberine bridge enzyme gene (anti-bbe) via somatic embryogenesis results in an altered ratio of alkaloids in latex but not in roots. *Transgenic Res.* **13**, 607-613.

- Frick S., Kramell R. & Kutchan T.M. (2007)** Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding. *Metab. Eng.* **9**, 169-176.
- Fried M. & Crothers D.M. (1981)** Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6505-6525.
- Fujii N., Inui T., Iwasa K., Morishige T. & Sato F. (2006)** Knockdown of berberine bridge enzyme by RNAi accumulates (*S*)-reticuline and activates a silent pathway in cultured California poppy cells. *Transgenic Res.* **16**, 363-375.
- Fujimoto S.Y., Ohta M., Usui A., Shinshi H. & Ohme-Takagi M. (2000)** *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404.
- Funk C., Gugler K. & Brodelius P. (1987)** Increased secondary product formation in plant-cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry* **26**, 401-405.
- Furihata T., Maruyama K., Fujita Y., Umezawa T., Yoshida R., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2006)** Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1988-1993.
- Gachon C.M., Langlois-Meurinne M., Henry Y. & Saindrenan P. (2005)** Transcriptional co-regulation of secondary metabolism enzymes in *Arabidopsis*: functional and evolutionary implications. *Plant Mol. Biol.* **58**, 229-245.
- Gang, D.R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K.H., Simon, J., Lewinsohn, E., & Pichersky, E. (2001)** An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Physiol.* **125**, 539-555.
- Garner M.M. & Revzin A. (1981)** A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3047-3060.
- Gerber H.P., Seipel K., Georgiev O., Hofferer M., Hug M., Rusconi S. & Schaffner W. (1994)** Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**, 808-811.
- Gesell A. (2008)** Identifizierung der Salutaridinsynthese CYP719B1 und einer FAD-abhängigen Oxygenase der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M. & Thomashow M.F. (1998)** Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.* **16**, 433-442.
- Goff S.A., Cone K.C. & Chandler V.L. (1992)** Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev.* **6**, 864-875.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., et al. (2002)** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**, 92-100.
- Goldfarb A.N. & Lewandowska K. (1994)** Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner. *Exp. Cell Res.* **214**, 481-485.

- Goodwin P.H., Oliver R.P. & Hsiang T. (2004)** Comparative analysis of expressed sequence tags from *Malva pusilla*, *Sorghum bicolor*, and *Medicago truncatula* infected with *Colletotrichum* species. *Plant Science* **167**, 481-489.
- Goossens A., Hakkinen S.T., Laakso I., Seppanen-Laakso T., Biondi S., De Sutter V., Lammertyn F., Nuutila A.M., Soderlund H., Zabeau M., Inzé D. & Oksman-Caldentey K.-M. (2003)** A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8595-8600.
- Green P.J., Yong M.-H, Cuozzo M., Kano-Murakami Y., Silverstein P. & Chua N.H. (1988)** Binding site requirements for pea nuclear protein factor GT-1 correlate with sequences required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J.* **7**, 4035-4044.
- Gress T.M., Hoheisel J.D., Lennon G.G., Zehetner G. & Lehrach H. (1992)** Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm. Genome* **3**, 609-619.
- Grobe N. (2005)** Genexpressionsanalysen in *Eschscholzia californica* und heterologe Expression zweier O-Methyltransferasen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Grotewold E., Chamberlin M., Snook M., Siame B., Butler L., Swenson J., Maddock S., St. Clair G. & Bowen B. (1998)** Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. *Plant Cell* **10**, 721-740.
- Gu Y.Q., Yang C., Thara V.K., Zhou J. & Martin G.B. (2000)** *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* **12**, 771-786.
- Guerineau F., Benjdia M. & Zhou D.X. (2003)** A jasmonate-responsive element within the *A. thaliana vsp1* promoter. *J. Exp. Bot.* **54**, 1153-1162.
- Gügler K., Funk C. & Brodelius P. (1988)** Elicitor-induced tyrosine decarboxylase in berberine-synthesizing suspension cultures of *Thalictrum rugosum*. *Eur. J. Biochem.* **170**, 661-666.
- Guilfoyle T.J. (1997)** The structure of plant gene promoters. In: *Genetic Engineering* **19** (ed. Setlow J.K.), 15-47, Plenum Press, New York.
- Gundlach H. (1992)** Das Abwehrsystem der Pflanzen: Reinigung eines Elicitors und Induktion von Sekundärstoffen in pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Gundlach H., Mueller M.J., Kutchan T.M. & Zenk M.H. (1992)** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2389-2393.
- Guo A., He K., Liu D., Bai S., Gu X., Wei L. & Luo J. (2005)** DATF: A Database of *Arabidopsis* Transcription Factors. *Bioinformatics* **21**, 2568-2569.
- Guo A.Y., Chen X., Gao G., Zhang H., Zhu Q.H., Liu X.C., Zhong Y.F., Gu X., He K. & Luo J. (2008)** PlantTFDB: a comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* **36**, D966-969.
- Guterman I., Shalit M., Menda N., Piestun D., Dafny-Yelin M., Shalev G., Bar E., Davydov O., Ovadis M., Emanuel M., Wang J., Adam Z., Pichersky E., Lewinsohn E., Zamir D., Vainstein A. & Weiss D. (2002)** Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* **14**, 2325-2338.

- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F. & Zhang J.Z. (2002)** Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130**, 639-648.
- Haider G., Kislinger T. & Kutchan T.M. (1997)** Barbiturate induced benzophenanthridine alkaloid formation proceeds by gene transcript accumulation in the California poppy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **241**, 606-610.
- Haider G., von Schrader T., Füsslein M., Blechert S. & Kutchan T.M. (2000)** Structure-activity relationships of synthetic analogs of jasmonic acid and coronatine on induction of benzo[c]phenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholzia californica* cell cultures. *Biol. Chem.* **381**, 741-748.
- Hao D., Ohme-Takagi M. & Sarai A. (1998)** Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J. Biol. Chem.* **273**, 26857-26861.
- Hart C.M., Nagy F. & Meins F Jr. (1993)** A 61 bp enhancer element of the tobacco beta-1,3-glucanase B gene interacts with one or more regulated nuclear proteins. *Plant Mol. Biol.* **21**, 121-131.
- Hartmann T. (1999)** Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* **207**, 483-495.
- Hartmann T. (2007)** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**, 2831-2846.
- Hartmann U., Sagasser M., Mehrtens F., Stracke R. & Weisshaar B. (2005)** Differential combinatorial interactions of *cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol. Biol.* **57**, 155-171.
- Haudenschild C., Schalk M., Karp F. & Croteau R. (2000)** Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 127-136.
- Hauschild K. (1995)** Molekulargenetische Untersuchungen zur Regulation des Berberinbrückenenzym aus *Eschscholtzia californica*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- He X.Z. & Dixon R.A. (2000)** Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. *Plant Cell* **12**, 1689-1702.
- Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B. & Bailey P.C. (2003)** The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 735-747.
- Heinze M., Steighardt J., Gesell A., Schwartze W. & Roos W. (2007)** Regulatory interaction of the G alpha protein with phospholipase A2 in the plasma membrane of *Eschscholzia californica*. *Plant J.* **52**, 1041-1051.
- Henzel W.J., Billeci T.M., Stults J.T., Wong S.C., Grimley C. & Watanabe C. (1993)** Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5011-5015.
- Herwig R., Schulz B., Weisshaar B., Hennig S., Steinfath M., Drungowski M., Stahl D., Wruck W., Menze A., O'Brien J., Lehrach H. & Radelof U. (2002)** Construction of a 'unigene' cDNA clone set by oligonucleotide fingerprinting allows access to 25000 potential sugar beet genes. *Plant J.* **32**, 845-857.

- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. & Korenaga T. (1999)** Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**, 297-300.
- Hileman L.C., Drea S., de Martino G., Litt A. & Irish V.F. (2005)** Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant J.* **44**, 334-341.
- Hill A., Nantel A., Rock C.D. & Quatrano R.S. (1996)** A conserved domain of the *viviparous-1* gene product enhances the DNA binding activity of the bZIP protein EmBP-1 and other transcription factors. *J. Biol. Chem.* **271**, 3366-3374.
- Hiratsu K., Matsui K., Koyama T. & Ohme-Takagi M. (2003)** Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 733-739.
- Hotze M., Schröder G. & Schröder J. (1995)** Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **374**, 345-350.
- Hoyng P.F. & van Beek L.M. (2000)** Pharmacological therapy for glaucoma: a review. *Drugs* **59**, 411-434.
- Hu Y., Zhao L., Chong K. & Wang T. (2008)** Overexpression of OsERF1, a novel rice ERF gene, up-regulates ethylene-responsive genes expression besides affects growth and development in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* **165**, 1717-1725.
- Huang F.-C. & Kutchan T.M. (2000)** Distribution of morphinan and benzo[*c*]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **53**, 555-564.
- Hughes T.R., Mao M., Jones A.R., Burchard J., Marton M.J., Shannon K.W., Lefkowitz S.M., Ziman M., Schelter J.M., Meyer M.R., Kobayashi S., Davis C., Dai H., He Y.D., Stephanian S.B., Cavet G., Walker W.L., West A., Coffey E., Shoemaker D.D., Stoughton R., Blanchard A.P., Friend S.H. & Linsley P.S. (2001)** Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol.* **19**, 342-347.
- Ignatov A., Clark W.G., Cline S.D., Psenak M., Krueger R.J. & Coscia C.J. (1996)** Elicitation of dihydrobenzophenanthridine oxidase in *Sanguinaria canadensis* cell cultures *Phytochemistry* **43**, 1141-1144.
- Ignatov A., Neuman M.C., Barg R., Krueger R.J. & Coscia C.J. (1997)** Immunoblot analyses of the elicited *Sanguinaria canadensis* enzyme, dihydrobenzophenanthridine oxidase: evidence for resolution from a polyphenol oxidase isozyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **347**, 208-212.
- Ikezawa N., Iwasa K. & Sato F. (2007)** Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylopine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *FEBS J.* **274**, 1019-1035.
- Ikezawa N., Iwasa K. & Sato F. (2008)** Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 which catalyzes an intramolecular C-C phenol coupling of (*S*)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 8810-8821.
- Ikezawa N., Iwasa K. & Sato F. (2009)** CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Rep.* **28**, 123-133.

- Ikezawa N., Tanaka M., Nagayoshi M., Shinkyo R., Sakaki T., Inouye K. & Sato F. (2003)** Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 38557-38565.
- Inoue H., Nojima H. & Okayama H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Inui T., Tamura K.I., Fujii N., Morishige T. & Sato F. (2007)** Overexpression of *Coptis japonica* norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase overcomes the rate-limiting step in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in cultured *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Physiol.* **48**, 252-262.
- Irmeler S., Schröder G., St-Pierre B., Crouch N.P., Hotze M., Schmidt J., Strack D., Matern U. & Schröder J. (2000)** Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J.* **24**, 797-804.
- Ito M., Araki S., Matsunaga S., Itoh T., Nishihama R., Machida Y., Doonan J.H. & Watanabe A. (2001)** G₂/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**, 1891-1905.
- Iturriaga G., Cushman M.A.F. & Cushman J.C. (2006)** An EST catalogue from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* reveals abiotic stress-adaptive genes. *Plant Science* **170**, 1173-1184.
- Itzhaki H., Maxson J.M. & Woodson W.R. (1994)** An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (*GST1*) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8925-8929.
- Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O. & Thomashow M.F. (1998)** *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**, 104-106.
- Jakoby M., Weisshaar B., Dröge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T. & Parcy F.; The bZIP Research Group. (2002)** bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7**, 106-111.
- Jennewein S., Rithner C.D., Williams R.M. & Croteau R. (2001)** Taxol biosynthesis: taxane 13a-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13595-13600.
- Jennewein S., Wildung M.R., Chau M., Walker K. & Croteau R. (2004)** Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9149-9154.
- Jin H., Cominelli E., Bailey P., Parr A., Mehrstens F., Jones J., Tonelli C., Weisshaar B. & Martin C. (2000)** Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **19**, 6150-6161.
- Jofuku K.D., den Boer B.G., Van Montagu M. & Okamoto J.K. (1994)** Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* **6**, 1211-1225.
- Jørgensen K., Rasmussen A.V., Morant M., Nielsen A.H., Bjarnholt N., Zagrobelny M., Bak S. & Møller B.L. (2005)** Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 280-291.

- Kagaya Y., Ohmiya K. & Hattori T. (1999)** RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* **27**, 470-478.
- Kammerer L., De-Eknamkul W. & Zenk M.H. (1994)** Enzymic 12-hydroxylation and 12-*O*-methylation of dihydrochelirubin in dihydromacarpin formation by *Thalictrum bulgaricum*. *Phytochemistry* **36**, 1409-1416.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki, K. (1999)** Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.* **17**, 287-291.
- Kato N., Dubouzet E., Kokabu Y., Yoshida S., Taniguchi Y., Dubouzet J.G., Yazaki K. & Sato F. (2007)** Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol.* **48**, 8-18.
- Kawalleck P., Plesch G., Hahlbrock K. & Somssich I.E. (1992)** Induction by fungal elicitor of *S*-adenosyl-L-methionine synthetase and *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4713-4717.
- Kazan K. (2006)** Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends Plant Sci.* **11**, 109-112.
- Kempe K. (2008)** Analyse der Benzylisochinolinalkaloid-Biosynthese des *Papaver somniferum* L. mit Hilfe der RNAi-Technik. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Ketchum R.E., Rithner C.D., Qiu D., Kim Y.S., Williams R.M. & Croteau R.B. (2003)** Taxus metabolomics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus x media* cell cultures. *Phytochemistry* **62**, 901-909.
- Ketchum R.E.B., Gibson D.M., Croteau R.B. & Shuler M.L. (1999)** The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotech. Bioeng.* **62**, 97-105.
- Kim S.-R., Choi J.L., Costa M.A. & An G. (1992)** Identification of G-Box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter. *Plant Physiol.* **99**, 627-631.
- Kim S.-Y., Kim Y.-C., Lee J.-H., Oh S.-K., Chung E., Lee S., Lee Y.-H., Choi D. & Park J.M. (2005)** Identification of a CaRAV1 possessing an AP2/ERF and B3 DNA-binding domain from pepper leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8ra by differential display. *Biochim. Biophys. Acta* **1729**, 141-146.
- Kim Y.S., Lee J.H., Yoon G.M., Cho H.S., Park S.-W., Suh M.C., Choi D., Ha H.J., Liu J.R. & Pai H.-S. (2000)** CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol.* **123**, 905-915.
- Kimura S., Chikagawa Y., Kato M., Maeda K. & Ozeki Y. (2008)** Upregulation of the promoter activity of the carrot (*Daucus carota*) phenylalanine ammonia-lyase gene (*DcPAL3*) is caused by new members of the transcriptional regulatory proteins, DcERF1 and DcERF2, which bind to the GCC-box homolog and act as an activator to the *DcPAL3* promoter. *J. Plant Res.* **121**, 499-508.
- Kirch T., Simon R., Grünewald M. & Werr W. (2003)** The *DORNRÖSCHEN / ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* gene of *Arabidopsis* acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development. *Plant Cell* **15**, 694-705.

- Kirsch C., Logemann E., Lippok B., Schmelzer E. & Hahlbrock K. (2001)** A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated CMPG1 gene in *Petroselinum crispum*. *Plant J.* **26**, 217-227.
- Klucher K.M., Chow H., Reiser L. & Fischer R.L. (1996)** The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* **8**, 137-153.
- Klvana M., Chen J., Lépine F., Legros R. & Jolicoeur M. (2006)** Analysis of secondary metabolites from *Eschscholtzia californica* by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **17**, 236-242.
- Krane B.D., Fagbule M.O., Shamma M. & Gözler B. (1984)** The benzophenanthridine alkaloids. *J. Nat. Prod.* **47**, 1-43.
- Kraus P.F.X. & Kutchan T.M. (1995)** Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2071-2075.
- Kreil D.P., Russell R.R. & Russell S. (2006)** Microarray oligonucleotide probes. *Methods Enzymol.* **410**, 73-98.
- Kutchan T.M. & Zenk M.H. (1993)** Enzymology and molecular biology of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *J. Plant Res. Special Issue* **3**, 165-173.
- Kutchan T.M. (1993)** 12-oxo-phytodienoic acid induces accumulation of berberine bridge enzyme transcript in a manner analogous to methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* **142**, 502-505.
- Kutchan T.M. (1998)** Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In: *The Alkaloids – Chemistry and Biology* **50** (Cordell G.A., Hrsg.), 267-316, Academic Press, San Diego, CA.
- Kutchan T.M., Ayabe S., Coscia E.M. & Coscia C.J. (1983)** Correlation of cytodifferentiation with alkaloid and catechol content in cultured *Papaver bracteatum* cells. *Plant Cell Reports* **2**, 281-284.
- Kutchan T.M. (2005)** A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 292-300.
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lange B.M., Wildung M.R., Stauber E.J., Sanchez C., Pouchnik D. & Croteau R. (2000)** Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2934-2939.
- Larkin P.J., Miller J.A., Allen R.S., Chitty J.A., Gerlach W.L., Frick S., Kutchan T.M., Fist A.J. (2007)** Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnol. J.* **5**, 26-37.
- Lee J.H., Kim D.M., Kim J., Bang J.W., Kim W.T. & Pai H.S. (2005)** Functional characterization of NtCEF1, an AP2/EREBP-type transcriptional activator highly expressed in tobacco callus. *Planta* **222**, 211-224.
- Lee M.W., Qi M. & Yang Y. (2001)** A novel jasmonic acid-inducible rice myb gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 527-535.
- Lehman A., Black R. & Ecker J.R. (1996)** *HOOKLESS1*, an ethylene responsive gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyls. *Cell* **85**, 183-184.

- Li R., Reed D.W., Liu E., Nowak J., Pelcher L.E., Page J.E. & Covello P.S. (2006)** Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement. *Chem. Biol.* **13**, 513-520.
- Liang H.X., Lu Y., Liu H.X., Wang F.D., Xin Z.Y. & Zhang Z.Y. (2008)** A novel activator-type ERF of *Thinopyrum intermedium*, TiERF1, positively regulates defence responses. *J. Exp. Bot.* **59**, 3111-3120.
- Linsmaier E.M. & Skoog F. (1965)** Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **18**, 100-127.
- Liscombe D.K. & Facchini P.J. (2007)** Molecular cloning and characterization of tetrahydroprotoberberine *cis-N*-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *J. Biol. Chem.* **282**, 14741-14751.
- Liscombe D.K., Macleod B.P., Loukanina N., Nandi O.I. & Facchini P.J. (2005)** Evidence for the monophyletic evolution of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* **66**, 1374-1393.
- Liu L., White M.J. & MacRae T.H. (1999)** Transcription factors and their genes in higher plants. Functional domains, evolution and regulation. *Eur. J. Biochem.* **262**, 247-257.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (1998)** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1391-1406.
- Logemann E., Tavernaro A., Schulz W., Somssich I.E. & Hahlbrock K. (2000)** UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1903-1907.
- Lopes Cardoso M.I., Meijer A.H., Rueb S., Machado J.A., Memelink J. & Hoge J.H. (1997)** A promoter region that controls basal and elicitor-inducible expression levels of the NADPH:cytochrome P450 reductase gene (*Cpr*) from *Catharanthus roseus* binds nuclear factor GT-1. *Mol. Gen. Genet.* **256**, 674-681.
- Ludwig S.R., Habera L.F., Dellaporta S.L. & Wessler S.R. (1989)** *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the *myc*-homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7092-7096.
- MacLeod B.P. & Facchini P.J. (2006)** Methods for regeneration and transformation in *Eschscholzia californica*: A model plant to investigate alkaloid biosynthesis. *Methods Mol. Biol.* **318**, 357-368.
- Magnani E., Sjolander K. & Hake S. (2004)** From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell* **16**, 2265-2277.
- Magome H., Yamaguchi S., Hanada A., Kamiya Y. & Oda K. (2004)** *dwarf and delayed-flowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J.* **37**, 720-729.
- Maldonado-Mendoza I.E., Lopez-Meyer M., Galef J.R., Burnett R.J., Nessler C.L. (1996)** Molecular analysis of a new member of the opium poppy tyrosine/3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase gene family. *Plant Physiol.* **110**, 43-49.
- Mao W., Berenbaum M.R. & Schuler M.A. (2008)** Modifications in the N-terminus of an insect cytochrome P450 enhance production of catalytically active protein in baculovirus-Sf9 cell expression systems. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 66-75.

- Margulies M., Egholm M., Altman W.E. et al. (2005)** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380.
- Mascarenhas A.K., Allen C.M. & Moeschberger M.L. (2002)** The association between Viadent use and oral leukoplakia - results of a matched case-control study. *J. Public Health Dent.* **62**, 158-162.
- Mason H.S., DeWald D.B. & Mullet J.E. (1993)** Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter. *Plant Cell* **5**, 241-251.
- Matsui K., Hiratsu K., Koyama T., Tanaka H. & Ohme-Takagi M. (2005)** A chimeric AtMYB23 repressor induces hairy roots, elongation of leaves and stems, and inhibition of the deposition of mucilage on seed coats in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **46**, 147-155.
- McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Schenk P.M., Edgar C.I., Maclean D.J., Scheible W.-R., Udvardi M.K. & Kazan K. (2005)** Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiol.* **139**, 949-959.
- Menke F.L., Champion A., Kijne J.W. & Memelink J. (1999 b)** A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J.* **18**, 4455-4463.
- Menke F.L., Parchmann S., Mueller M.J., Kijne J.W. & Memelink J. (1999 a)** Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **119**, 1289-1296.
- Mewes H.W., Frishman D., Gruber C., Geier B., Haase D., Kaps A., Lemcke K., Mannhaupt G., Pfeiffer F., Schüller C., Stocker S. & Weil B. (2000)** MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res.* **28**, 37-40.
- Minami H., Dubouzet E., Iwasa K. & Sato F. (2007)** Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **282**, 6274-6282.
- Money T., Reader S., Qu L.J., Dunford R.P. & Moore G. (1996)** AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2616-2617.
- Montgomery J., Goldman S., Deikman J., Margossian L. & Fischer R.L. (1993)** Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5939-5943.
- Moose, S. P. & Sisco, P. H. (1996)** *GLOSSY15*, an *APETALA2*-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes Dev.* **10**, 3018-3027.
- Morishige T., Dubouzet E., Choi K.-B., Yazaki K. & Sato F. (2002)** Molecular cloning of columbamine *O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5659-5667.
- Morishige T., Tsujita T., Yamada Y. & Sato F. (2000)** Molecular characterization of the *S*-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine 4'-*O*-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **275**, 23398-23405.
- Mráček J., Greiner S., Cho W.K., Rauwolf U., Braun M., Umate P., Altstätter J., Stoppel R., Mlcochová L., Silber M.V., Volz S.M., White S., Selmeier R., Rudd S., Herrmann R.G. & Meurer J. (2006)** Construction, database integration, and application of an *Oenothera* EST library. *Genomics* **88**, 372-380.

- Mueller M.J., Brodschelm W., Spannagl E. & Zenk M.H. (1993)** Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7490-7494.
- Mullis K.B. & Faloona F.A. (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Murata J. & De Luca V. (2005)** Localization of tabersonine 16-hydroxylase and 16-OH tabersonine-16-*O*-methyltransferase to leaf epidermal cells defines them as a major site of precursor biosynthesis in the vindoline pathway in *Catharanthus roseus*. *Plant J.* **44**, 581-594.
- Murata J., Bienzle D., Brandle J.E., Sensen C.W. & De Luca V. (2006)** Expressed sequence tags from Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). *FEBS Lett.* **580**, 4501-4507.
- Murata J., Roepke J., Gordon H. & De Luca V. (2008)** The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *Plant Cell* **20**, 524-542.
- Nagel J., Culley L.K., Lu Y., Liu E., Matthews P.D., Stevens J.F. & Page J.E. (2008)** EST analysis of hop glandular trichomes identifies an *O*-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *Plant Cell* **20**, 186-200.
- Nakano T., Nishiuchi T., Suzuki K., Fujimura T. & Shinshi H. (2006 b)** Studies on transcriptional regulation of endogenous genes by ERF2 transcription factor in tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* **47**, 554-558.
- Nakano T., Suzuki K., Fujimura T. & Shinshi H. (2006 a)** Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol.* **140**, 411-432.
- Nakano T., Suzuki K., Ohtsuki N., Tsujimoto Y., Fujimura T. & Shinshi H. (2006 c)** Identification of genes of the plant-specific transcription-factor families cooperatively regulated by ethylene and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **119**, 407-413.
- Nelson D.R., Schuler M.A., Paquette S.M., Werck-Reichhart D. & Bak S. (2004)** Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol.* **135**, 756-772.
- Nicolaou K.C., Yang Z., Liu J.J., Ueno H., Nantermet P.G., Guy P.K., Claiborne C.F., Renaud J., Couladouros E.A., Paulvannan K. & Sorensen E.J. (1994)** Total synthesis of Taxol. *Nature* **367**, 630-634.
- Nole-Wilson S. & Krizek B.A. (2000)** DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4076-4082.
- Novak B.H., Hudlicky T., Reed J.W., Mulzer J. & Trauner D. (2000)** Morphine synthesis and biosynthesis - an update. *Curr. Org. Chem.* **4**, 343-362.
- Novy R., Drott D., Yaeger K. & Mierendorf R. (2001):** Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *inNovations* **12**, 1-3.
- Novy R., Drott D., Yaeger K. & Mierendorf R. (2003):** Rosetta™ 2(DE3) Competent Cells for enhanced coverage of codon bias in *E. coli*. *inNovations* **18**, 28.
- O'Keefe B.R. & Beecher C. (1994)** Isolation and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:tetrahydroberberine-*cis-N*-methyltransferase from suspension cultures of *Sanguinaria canadensis* L. *Plant Physiol.* **105**, 395-403.
- Ober D. (2005)** Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* **10**, 444-449.

- Ohme-Takagi M. & Shinshi H. (1995)** Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182.
- Ohta M., Matsui K., Hiratsu K., Shinshi H. & Ohme-Takagi M. (2001)** Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-1968.
- Ohta M., Ohme-Takagi M. & Shinshi H. (2000)** Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J.* **22**, 29-38.
- Okamuro J.K., Caster B., Villarreal R., VanMontagu M. & Jofuku K.D. (1997)** The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7076-7081.
- Oksman-Caldentey K.-M. & Inzé D. (2004)** Plant cell factories in the post-genomic area: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* **9**, 433-440.
- Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B. & Baganz F. (1998)** Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **16**, 373-378.
- Oñate-Sánchez L. & Singh K.B. (2002)** Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol.* **128**, 1313-1322.
- Ono E., Nakai M., Fukui Y., Tomimori N., Fukuchi-Mizutani M., Saito M., Satake H., Tanaka T., Katsuta M., Umezawa T. & Tanaka Y. (2006)** Formation of two methylenedioxy bridges by a *Sesamum* CYP81Q protein yielding a furofuran lignan, (+)-sesamin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10116-10121.
- Ounaroon A., Decker G., Schmidt J., Lottspeich F. & Kutchan T.M. (2003)** (*R,S*)-Reticuline 7-*O*-methyltransferase and (*R,S*)-norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase of *Papaver somniferum* - cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant J.* **36**, 808-819.
- Ouwerkerk P.B. & Memelink J. (1999)** Elicitor-responsive promoter regions in the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol. Biol.* **39**, 129-136.
- Pabo C.O. & Sauer R.T. (1992)** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L. & Drake R. (2005)** Improving the nutritional value of golden rice through increased pro-vitamin A content. *Nat. Biotechnol.* **23**, 482-487.
- Pandey A.V., Tekwani B.L., Singh R.L. & Chauhan V.S. (1999)** Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. *J. Biol. Chem.* **274**, 19383-19388.
- Pandey G.K., Grant J.J., Cheong Y.H., Kim B.G., Li L. & Luan S. (2005)** ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**, 1185-1193.
- Panicot M., Minguet E.G., Ferrando A., Alcázar R., Blázquez M.A., Carbonell J., Altabella T., Koncz C. & Tiburcio A.F. (2002)** A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2539-2551.
- Parchmann S., Gundlach H. & Mueller M.J. (1997)** Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited cell cultures. *Plant Physiol.* **115**, 1057-1064.

- Park H.C., Kim M.L., Kang Y.H., Jeon J.M., Yoo J.H., Kim M.C., Park C.Y., Jeong J.C., Moon B.C., Lee J.H., Yoon H.W., Lee S.-H., Chung W.S., Lim C.O., Lee S.Y., Hong J.C. & Cho M.J. (2004)** Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol.* **135**, 2150-2161.
- Park S.-U., Yu M. & Facchini P.J. (2002)** Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy. *Plant Physiol.* **128**, 696-706.
- Park S.-U., Yu M. & Facchini P.J. (2003)** Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Mol. Biol.* **51**, 153-164.
- Pasquali G., Erven A.S.W., Ouwkerk P.B.F., Menke F.M.H. & Memelink J. (1999)** The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Mol. Biol.* **39**, 1299-1310.
- Pauli H.H. & Kutchan T.M. (1998)** Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (*S*)-*N*-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyl-isoquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J.* **13**, 793-801.
- Pauw B., Hilliou F.A., Martin V.S., Chatel G., de Wolf C.J., Champion A., Pré M., van Duijn B., Kijne J.W., van der Fits L. & Memelink J. (2004)** Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 52940-52948.
- Paz-Ares J., Ghosal D., Wienand U., Peterson P.A & Saedler H. (1987)** The regulatory *cl* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J.* **6**, 3553-3558.
- Pichersky E. & Gang D.R. (2000)** Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* **5**, 439- 445.
- Porath J., Carlsson J., Olsson I. & Belfrage G. (1975)** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Pré M. (2006)** ORA EST: Functional analysis of jasmonate-responsive AP2/ERF-domain transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. Ph.D. thesis, Leiden University, Leiden, The Netherlands.
- Pré M., Atallah M., Champion A., De Vos M., Pieterse C.M. J & Memelink J. (2008)** The AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* **147**, 1347-1357.
- Preininger V. (1986)** Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. In: *The Alkaloids – Chemistry and Pharmacology* (Brossi A., ed.) Academic Press, San Diego, **29**, 1-98.
- Prestridge D.S. (1991)** SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Comput. Appl. Biosci.* **7**, 203-206.
- Ptashne M. (1988)** How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**, 683-689.
- Ralston L., Kwon S.T., Schoenbeck M., Ralston J., Schenk D.J., Coates R.M. & Chappell J. (2001)** Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-*epi*-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Arch. Biochem. Biophys.* **393**, 222-235.

- Rice K.C. (1980)** Synthetic opium alkaloids and derivatives. A short total synthesis of (+)-dihydrothebainone, (+)-dihydrocodeinone, and (+)-nordihydrocodeinone as an approach to a practical synthesis of morphine, codeine, and congeners. *J. Org. Chem.* **45**, 3135-3137.
- Riechmann J.L. & Meyerowitz E.M. (1998)** The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol. Chem.* **379**, 633-646.
- Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O.J., Samaha R.R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J.Z., Ghandehari D., Sherman B.K. & Yu G. (2000)** *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.
- Rink E. & Böhm H. (1975)** Conversion of reticuline into scoulerine by a cell free preparation from *Macleaya microcarpa* cell suspension cultures. *FEBS Lett.* **49**, 396-399.
- Rischer H., Oresic M., Seppänen-Laakso T., Katajamaa M., Lammertyn F., Ardiles-Diaz W., Van Montagu M.C., Inzé D., Oksman-Caldentey K.M., Goossens A. (2006)** Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5614-5619.
- Ro D.-K., Ehling J. & Douglas C.J. (2002)** Cloning, functional expression, and subcellular localization of multiple NADPH-Cytochrome P450 reductases from hybrid poplar. *Plant Physiol.* **130**, 1837-1851.
- Roos W., Evers S., Hieke M., Tschöpe M. & Schumann B. (1998)** Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Physiol.* **118**, 349-364.
- Rosco A., Pauli H.H., Priesner W. & Kutchan T.M. (1997)** Cloning and heterologous expression of NADPH-cytochrome P450 reductases from the *Papaveraceae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**, 369-377.
- Rothenberg M.L. (1997)** Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann. Oncol.* **8**, 837-855.
- Rudd S. (2003)** Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends Plant Sci.* **8**, 321-329.
- Rueffer M. & Zenk M.H. (1987 a)** Distant precursors of benzyloquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Z. Naturforsch.* **42c**, 319-332.
- Rueffer M. & Zenk M.H. (1987 b)** Enzymatic formation of protopines by a microsomal cytochrome P-450 system of *Corydalis vaginans*. *Tetrahedron Lett.* **28**, 5307-5310.
- Rueffer M. & Zenk M.H. (1994)** Canadine synthase from *Thalictrum tuberosum* cell cultures catalyzes the formation of the methylenedioxy bridge in berberine synthesis. *Phytochemistry* **36**, 1219-1223.
- Rueffer M., El-Shagi H., Nagakura N. & Zenk M.H. (1981)** (*S*)-Norlaudanoline synthase: the first enzyme in the benzyloquinoline biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* **129**, 5-9.
- Rueffer M., Nagkura N. & Zenk M.H. (1983)** Partial purification and properties of *S*-adenosylmethionine: (*R*), (*S*)-norlaudanoline-6-*O*-methyltransferase from *Argemone platyceras* cell cultures. *Planta Med.* **49**, 131-137.
- Rueffer M., Zumstein G. & Zenk M.H. (1990)** Partial purification and properties of *S*-adenosyl-L-methionine: (*S*)-Tetrahydroprotoberberine-*cis-N*-Methyltransferase from suspension-cultured cells of *Eschscholtzia* and *Corydalis*. *Phytochemistry* **29**, 3727-3733.

- Ruepp A., Zollner A., Maier D., Albermann K., Hani J., Mokrejs M., Tetko I., Guldener U., Mannhaupt G., Munsterkötter M. & Mewes H.W. (2004)** The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5539-5545.
- Rush M.D., Kutchan T.M. & Coscia C.J. (1985)** Correlation of the appearance of alkaloids and laticifer cells in germinating *P. bracteatum* seedlings. *Plant Cell Reports* **4**, 237-240.
- Rushton P.J., Torres J.T., Parniske M., Wernert P., Hahlbrock K. & Somssich I.E. (1996)** Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* **15** 5690-5700.
- Sabarna K. (2006)** Approaches to isolating a cDNA encoding thebaine synthase of morphine biosynthesis from opium poppy *Papaver somniferum* L. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. & Arnheim N. (1985)** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sainz M.B., Goff S.A. & Chandler V.L. (1997)** Extensive mutagenesis of a transcriptional activation domain identifies single hydrophobic and acidic amino acids important for activation *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 115-122.
- Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2002)** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **290**, 998-1009.
- Saldanha A.J. (2004)** Java Treeview - extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**, 3246-3248.
- Samanani N. & Facchini P.J. (2001)** Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy. *Planta* **213**, 898-906.
- Samanani N. & Facchini P.J. (2002)** Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **277**, 33878-33883.
- Samanani N., Liscombe D.K. & Facchini P.J. (2004)** Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J.* **40**, 302-313.
- Samanani N., Park S.U. & Facchini P.J. (2005)** Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell* **17**, 915-926.
- Sambrook J. & Russell D.W. (2001)** Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition. CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sasaki K., Mitsuhashi I., Seo S., Ito H., Matsui H. & Ohashi Y. (2007)** Two novel AP2/ERF domain proteins interact with *cis*-element VWRE for wound-induced expression of the Tobacco *tpoxNI* gene. *Plant J.* **50**, 1079-1092.

- Sato F., Kitajima S., Koyama T. & Yamada Y. (1996)** Ethylene-induced gene expression of osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC *cis*-sequence. *Plant Cell Physiol.* **37**, 249-255.
- Sato F., Takeshita N., Fitchen J.H., Fujiwara H. & Yamada Y. (1993)** *S*-adenosyl-L-methionine:scoulerine-9-*O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry* **32**, 659-664.
- Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carre I.A. & Coupland G. (1998)** The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-1229.
- Schalk M. & Croteau R. (2000)** A single amino acid substitution (F363I) converts the regiochemistry of the spearmint (-)-limonene hydroxylase from a C6- to a C3-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11948-11953.
- Schena M., Shalon D., Davies R.W. & Brown P.O. (1995)** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- Schmid M., Uhlenhaut N.H., Godard F., Demar M., Bressan R., Weigel D. & Lohmann J.U. (2003)** Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* **130**, 6001-6012.
- Schopfer C.R. & Ebel J. (1998)** Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 315-322.
- Schuler M.A. & Werck-Reichhart D. (2003)** Functional genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 629-667.
- Schumacher H.-M. & Zenk M.H. (1988)** Partial purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **7**, 43-46.
- Schumacher H.M., Gundlach H., Fiedler F. & Zenk M.H. (1987)** Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Rep.* **6**, 410-413.
- Schumacher H.M., Rueffer M., Nagakura N. & Zenk M.H. (1983)** Partial purification and properties of (*S*)-Norlaudanoline synthase from *Eschscholtzia tenuifolia* cell cultures. *Planta Med.* **48**, 212-220.
- Sessa G., Meller Y. & Fluhr R. (1995)** A GCC element and a G-box motif participate in ethylene-induced expression of the PRB-1b gene. *Plant Mol. Biol.* **28**, 145-153.
- Shaikhali J., Heiber I., Seidel T., Ströher E., Hiltcher H., Birkmann S., Dietz K.J. & Baier M. (2008)** The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biol.* **8**, 48.
- Shendure J., Porreca G.J., Reppas N.B., Lin X., McCutcheon J.P., Rosenbaum A.M., Wang M.D., Zhang K., Mitra R.D. & Church G.M. (2005)** Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* **309**, 1728-1732.
- Shigyo M., Hasebe M. & Ito M. (2006)** Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene* **366**, 256-265.
- Shinshi H., Usami S. & Ohme-Takagi M. (1995)** Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol. Biol.* **27**, 923-932.

- Shitan N., Bazin I., Dan K., Obata K., Kigawa K., Ueda K., Sato F., Forestier C. & Yazaki K. (2003)** Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 751-756.
- Shukla A.K., Shasany A.K., Gupta M.M. & Khanuja S.P. (2006)** Transcriptome analysis in *Catharanthus roseus* leaves and roots for comparative terpenoid indole alkaloid profiles. *J. Exp. Bot.* **57**, 3921-3932.
- Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A. & Lukyanov S.A. (1995)** An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1087-1088.
- Siminszky B., Gavilano L., Bowen S.W. & Dewey R.E. (2005)** Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14919-14924.
- Sirikantaramas S., Morimoto S., Shoyama Y., Ishikawa Y., Wada Y., Shoyama Y. & Taura F. (2004)** The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Delta1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *J. Biol. Chem.* **279**, 39767-39774.
- Smith H.M.S. & Raikhel N.V. (1999)** Protein targeting to the nuclear pore. What can we learn from plants? *Plant Physiol.* **119**, 1157-1163.
- Sohn K.H., Lee S.C., Jung H.W., Hong J.K. & Hwang B.K. (2006)** Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* **61**, 897-915.
- Solano R., Stepanova A., Chao Q. & Ecker J.R. (1998)** Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* **12**, 3703-3714.
- Sønderby I.E., Hansen B.G., Bjarnholt N., Ticconi C., Halkier B.A. & Kliebenstein D.J. (2007)** A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. *PLoS ONE* **2** (12), e1322.
- Song C.-P., Agarwal M., Ohta M., Guo Y., Halfter U., Wang P. & Zhua J.-K. (2005)** Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **17**, 2384-2396.
- Sreenivasulu N., Altschmied L., Radchuk V., Gubatz S., Wobus U. & Weschke W. (2004)** Transcript profiles and deduced changes of metabolic pathways in maternal and filial tissues of developing barley grains. *Plant J.* **37**, 539-553.
- Stadler R. & Zenk M.H. (1990)** A revision of the generally accepted pathway for the biosynthesis of the benzyltetrahydroisoquinoline alkaloid reticuline. *Liebigs Ann. Chem.*, 555-562.
- Stadler R. & Zenk M.H. (1993)** The purification and characterization of a unique Cytochrome-P-450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell cultures. *J. Biol. Chem.* **268**, 823-831.
- Stadler R., Kutchan T.M. & Zenk M.H. (1989)** (S)-Norcoclaurine is the central intermediate in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **28**, 1083-1086.
- Stadler R., Kutchan T.M., Löffler S., Nagakura N., Cassels B. & Zenk, M.H. (1987)** Revision of the early steps of reticuline biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **28**, 1251-1254.
- Stadler R., Löffler S., Cassels B. & Zenk, M.H. (1988)** Bisbenzyloquinoline biosynthesis in *Berberis stolonifera* cell cultures. *Phytochemistry* **27**, 2557-2565.

- Steffens P., Nagakura N. & Zenk M.H. (1985)** Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry* **24**, 2577-2583.
- Stockinger E.J., Gilmour S.J. & Thomashaw M.F. (1997)** *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1035-1040.
- Stracke R., Werber M. & Weisshaar B. (2001)** The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 447-456.
- Sugimoto K., Takeda S. & Hirochika H. (2000)** MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon *Tto1* and defense-related genes. *Plant Cell* **12**, 2511-2527.
- Suttipanta N., Pattanaik S., Gunjan S., Xie C.H., Littleton J. & Yuan L. (2007)** Promoter analysis of the *Catharanthus roseus* geraniol 10-hydroxylase gene involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1769**, 139-148.
- Takeshita N., Fujiwara H., Mimura H., Fitchen J.H., Yamada Y. & Sato F. (1995)** Molecular cloning and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:scoulerine-9-*O*-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol.* **36**, 29-36.
- Tanahashi T. & Zenk M.H. (1990 a)** New hydroxylated benzo[*c*]phenanthridine alkaloids from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.* **53**, 579-586.
- Tanahashi T. & Zenk M.H. (1990 b)** Elicitor induction and characterization of microsomal protopine-6-hydroxylase, the central enzyme in benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **29**, 1113-1122.
- Terry N., Van Montagu M., Inzé D. & Goossens A. (2006)** Functional genomic approaches to study and engineer secondary metabolism in plant cell cultures. In *Medicinal and aromatic plants*. (Bogers L.J., Craker L.E. & Lange D.; Hrsg.) Springer, Niederlande, 291-300.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- The Gene Ontology Consortium (2000)** Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* **25**, 25-29.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994)** ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Toledo-Ortiz G., Huq E. & Quail P.H. (2003)** The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749-1770.
- Tournier B., Sanchez-Ballesta M.T., Jones B., Pesquet E., Regad F., Latche A., Pech J.C. & Bouzayen M. (2003)** New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett.* **550**, 149-154.
- Tsukuda S., Gomi K., Yamamoto H. & Akimitsu K. (2006)** Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. *Plant Mol. Biol.* **60**, 125-136.
- Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., et al. (2006)** The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**, 1596-1604.

- Van de Peer Y. & De Wachter R. (1994)** TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569-570.
- van der Fits L. & Memelink J. (2000)** ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**, 295-297.
- van der Fits L. & Memelink J. (2001)** The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J.* **25**, 43-53.
- van der Graaff E., Dulk-Ras A.D., Hooykaas P.J.J. & Keller B. (2000)** Activation tagging of the *LEAFY PETIOLE* gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**, 4971-4980.
- van Wyk B.-E., Wink C. & Wink M. (2003)** Handbuch der Arzneipflanzen : ein illustrierter Leitfaden. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Seite 138.
- Vázquez-Flota F., De Luca V., Carrillo-Pech M., Canto-Flick A., de Lourdes Miranda-Ham M. (2002)** Vindoline biosynthesis is transcriptionally blocked in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Mol. Biotechnol.* **22**, 1-8.
- Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B. & Kinzler K.W. (1995)** Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487.
- Verpoorte R., van der Heijden R. & Memelink J. (2000)** Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res.* **9**, 323-343.
- Verpoorte R., van der Heijden R., ten Hoopen H.J.G. & Memelink J. (1999)** Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett.* **21**, 467-479.
- Viehweger K., Dordschbal B. & Roos W. (2002)** Elicitor-activated phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signaling via the activation of Na⁺-dependent proton fluxes. *Plant Cell* **14**, 1509-1525.
- Viehweger K., Schwartz W., Schumann B., Lein W. & Roos W. (2006)** The Ga protein controls a pH-dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell* **18**, 1510-1523.
- Villain P., Mache R. & Zhou D.-X. (1996)** The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *J. Biol. Chem.* **271**, 32593-32598.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., et al. (1995)** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407-4414.
- Wang G., Tian L., Aziz N., Broun P., Dai X., He J., King A., Zhao P.X. & Dixon R.A. (2008)** Terpene Biosynthesis in Glandular Trichomes of Hop. *Plant Physiol.* **148**, 1254-1266.
- Wang Z.Y., Kenigsbuch D., Sun L., Harel E., Ong M.S., Tobin E.M. (1997)** A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis Lhcb* gene. *Plant Cell* **9**, 491-507.
- Washburn K.B., Davis E.A. & Ackerman S. (1997)** Coactivators and TAFs of transcription activation in wheat. *Plant Mol. Biol.* **35**, 1037-1043.
- Washburn M.P., Wolters D. & Yates J.R. 3rd. (2001)** Largescale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242-247.

- Wasternack C. (2007)** Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot. (Lond.)* **100**, 681-697.
- Wege S., Scholz A., Gleissberg S. & Becker A. (2007)** Highly efficient virus-induced gene silencing (VIGS) in California poppy (*Eschscholzia californica*): an evaluation of VIGS as a strategy to obtain functional data from non-model plants. *Ann. Bot. (Lond.)* **100**, 641-649.
- Wei G., Pan Y., Lei J. & Zhu Y.X. (2005)** Molecular cloning, phylogenetic analysis, expressional profiling and in vitro studies of TINY2 from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 440-446.
- Weiler E.W., Kutchan T.M., Gorba T., Brodschelm W., Niesel U., Bublitz F. (1994)** The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Lett.* **345**, 9-13.
- Weiß D. (2004)** Die Sanguinarin-Reduktase - ein neues Redoxenzym mit essentiellen Funktionen in Metabolismus und Kompartimentierung der Benzophenanthridine in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Weiss D., Baumert A., Vogel M. & Roos W (2006)** Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant Cell Environ.* **29**, 291-302.
- Wen W., Meinkoth J.L., Tsien R.Y. & Taylor S.S. (1995)** Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463-473.
- Wheeler D.L., Barrett T., Benson D.A. et al., (2008)** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **36** (Database issue), D13-21.
- Wilson K., Long D., Swinburne J. & Coupland G. (1996)** A dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an *Arabidopsis* gene related to APETALA2. *Plant Cell* **8**, 659-671.
- Wink M. (2003)** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.
- Winkel B.S.J. (2004)** Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 85-107.
- Wuitschick J.D., Lindstrom P.R., Meyer A.E. & Karrer K.M. (2004)** Homing endonucleases encoded by germ line-limited genes in *Tetrahymena thermophila* have APETALA2 DNA binding domains. *Eukaryot. Cell* **3**, 685-694.
- Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (1994)** A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**, 251-264.
- Yamamoto S., Suzuki K. & Shinshi H. (1999)** Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. *Plant J.* **20**, 571-579.
- Yang H.-J., Shen H., Chen L., Xing Y.-Y., Wang Z.-Y., Zhang J.-L. & Hong M.-M. (2002)** The *OsEBP-89* gene of rice encodes a putative EREBP transcription factor and is temporally expressed in developing endosperm and intercalary meristem. *Plant Mol. Biol.* **50**, 379-391.
- Yang Z., Tian L., Latoszek-Green M., Brown D. & Wu K. (2005)** *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol. Biol.* **58**, 585-596.

- Ye X.D., Al-Babili S., Klotti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. & Potrykus, I. (2000)** Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**, 303-305.
- Yu J., Hu S., Wang J., et al. (2002)** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**, 79-92.
- Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y. & Hara Y. (1996)** Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1129-1132.
- Yun D.J., Hashimoto T. & Yamada Y. (1992)** Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11799-11803.
- 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. (1994)** The formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* **66**, 2023-2028.
- Zhang H., Huang Z., Xie B., Chen Q., Tian X., Zhang X., Lu X., Huang D. & Huang R. (2004)** The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta* **220**, 262-270.
- Zhang Y. & Wang L. (2005)** The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology* **5**:1.
- Zhao J., Davis L.C. & Verpoorte R. (2005)** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **23**, 283-333.
- Zhou J., Tang X. & Martin G.B. (1997)** The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.* **16**, 3207-3232.
- Ziegler J. & Facchini P.J. (2008)** Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 735-769.
- Ziegler J., Diaz-Chávez M.L., Kramell R., Ammer C. & Kutchan T.M. (2005)** Comparative macroarray analysis of morphine containing *Papaver somniferum* and eight morphine-free *Papaver* species identifies an *O*-methyltransferase involved in benzyloquinoline biosynthesis. *Planta* **222**, 458-471.
- Ziegler J., Voigtländer S., Schmidt J., Kramell R., Miersch O., Ammer C., Gesell A. & Kutchan T.M. (2006)** Comparative transcript and alkaloid profiling in *Papaver* species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *Plant J.* **48**, 177-192.
- Zulak K.G., Cornish A., Daskalchuk T.E., Deyholos M.K., Goodenowe D.B., Gordon P.M.K., Klassen D., Pelcher L.E., Sensen C.W. & Facchini P.J. (2007)** Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta* **225**, 1085-1106.

7 Anhang

7.1 cDNA-Sequenzen und daraus abgeleitete Aminosäuresequenzen

```

1 gattccttcttggtgatgacaagatagagatttcttgggaagattatcccgatcggtg 60
61 aacgattttcagtaaggaagATGTGTGGTGGAGCTATCATCTCTGATTTTATTCCGACG 120
1 M C G G A I I S D F I P T 13
121 AGTCGGTTCGAGACGACTCACTGCTGGTTATCTTTGGCCGGATTCTGAAGAAAAACGCCGGA 180
14 S R S R R L T A G Y L W P D S K K N A G 33
181 AATAACCGTTCCAAGTCACTCCGTTCTGAGTTTATGAATGTTGATGATGATTTTCGAGGCT 240
34 N N R S K S L R S E F M N V D D D F E A 53
241 GATTTTCAGGAATTC AAGGATGATGGGTCTGAAGATGAAGTAGGTGTTAAATCTTTCTCA 300
54 D F Q E F K D D G S E D E V G V K S F S 73
301 TTTACCGCCAAATCTGCTGGTGCTCGAGGATCTACTGCTGTAAAATCTGTAGAGTACAAT 360
74 F T A K S A G A R G S T A V K S V E Y N 93
361 GGGCCTGCGGAGAAATCTGCAAAAAGGAAGAGGAAAAATCAATATCGAGGAATCCGACAG 420
94 G P A E K S A K R K R K N Q Y R G I R Q 113
421 CGTCCATGGGGAAAATGGGCGGCTGAGATCAGAGACCCCAAGGAAAGGTGTTTCGGGTATGG 480
114 R P W G K W A A E I R D P R K G V R V W 133
481 TTAGGAACCTTCAACACCGCTGAAGAAGCTGCTAGGGCTTACGATGCTGAGGCACGTAGG 540
134 L G T F N T A E E A A R A Y D A E A R R 153
541 ATTTCGAGGAAATAAAGCCAAAGTGAACCTTCTCTGATGAGAGTCCACCACCAGTTGAACAA 600
154 I R G N K A K V N F P D E S P P P V E Q 173
601 CCCGCTGTGAAGGCAAACCTTCATAATCAACTTCTGTGGCGGATAACCCAACAATGGTG 660
174 P A V K A N L H N Q L P V A D N P T M V 193
661 AAACCAAATATCGACGCTGATCACATTTTGACCTGGATGAGGATTTCTTCAACTCCCAGG 720
194 K P N I D A D H I L T W M R I S S T P R 213
721 GTTTCATGGAAGAGAAGGCAGAGTATTTGAattccatctcctcaattgagaacccaatca 780
214 V S W K R R Q S I * 222
781 gctaccaatctatgacctcttctgatactgggagacagtggttatctctgatcaaggaa 840
841 gtaactccttcaactgtcctgacttcgcacatggggagaacgtgacccaagaactccagaaa 900
901 ttgcatcagttctgatgccccaccatagaagntgacgaatctgatttctcgggtgatgcc 960
961 aacccaattaagaaantncaaaacnaa 988

```

Abb. 7.1: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Transkriptionsfaktors **EcaERF1** (cDNA 08G07). Start- und Stopcodon sowie die DNA-Bindungsdomäne sind durch Fettdruck markiert.

```

1 atctctctctctctcttacttcatcatctctctctctcaacttctaacttcatctctccggtt 60
61 tttcataATGGCAACAAATGATGAAGCTTCAACTCTTAACCTCATCAGGCAACATCTCCT 120
1 M A T N D E A S T L N L I R Q H L L 18
121 TGGAGATTCCAGATCTCTAGAAAGCTTCCCTCAACCAATAACAGACTCAGAAAATGATTC 180
19 G D S R S L E S F L N Q I T D S E N D S 38
181 GTCTTATCAACACAAACCCCAACTCAATTCAGCTTCTTCCGTATCAGATTCTTCATCAAA 240
39 S Y Q H K P Q L N S A S S V S D S S S K 58
241 AACTTCAAATTCACCATTTCTAATTCATTTTTTTCAAACCAAATCTTAAATTTGATGA 300
59 T S N S T I S N S I F S N Q N L K F D E 78
301 AGATACAAGAAACTCCAGTATTTTTGAATTTATATCTAAACCAATCAAGAACGAGAATGA 360
79 D T R N S S I F E F I S K P I K N E N D 98
361 TTATTCTCGATTTCGAAATCACACTCAAATTCCTCTCTTAGTCCAATAATTCAGATTT 420
99 Y S R F E I T H S N S L S P T N S D F 118
421 CACSTTTGTTTCAGATCGAAAACCTTCATTAAGATCTCTCTTCCCTTCAKTTAAAAACA 480
119 T F V H D R K P S L K I S L P S ? K K H 138
481 CAATTGGACTACTACTACTACTGGACAAACTCCGATAGATACCGTTAAAAACAAGGAA 540
139 N W T T T T T T G Q T P I D T V K T R K 158
541 ATACAGAGGAGTAAGGCAACGACCATGGGGTAAATTTGCAGCTGAAATTAGAGACCCAAA 600
159 Y R G V R Q R P W G K F A A E I R D P N 178
601 TAGAAAAGGTTCTAGGGTTTGGCTTGGTACTTTTTGAAACGGGCATTGAAGCTGCTAAAGC 660
179 R K G S R V W L G T F E T G I E A A K A 198
661 TTACGATTTCAGCTGCCTTTAAGATGAGAGGAAGCAAAGCTATTTTAAATTTCCCACTTGA 720
199 Y D S A A F K M R G S K A I L N F P L E 218
721 AGCTGGAAAACAATCAAGGGAACAGTAATCAATATTTGCCGAAAAGGGGAAAGGAAGA 780
219 A G K Q S R E P V I N I C R K R G K E E 238
781 AATTGAAACAGAAGAAATCAAAGTTATTAACAGATTAAGAGAGACGAATCACCGGAATT 840
239 I E T E E I K V I K Q I K R D E S P E F 258
841 TGAACAACAAGTCTTGTGTAAAAAATTCCCGGCAACAAGTCCGTTAACGCCGTCAAATTG 900
259 E N K S C V K K F P A T S P L T P S N W 278
901 GGCCTGTATTTGGGATGGTATGGATATTAACGGTGTATTTGACGTCCCATTACTATCGCC 960
279 A C I W D G M D I N G V F D V P L L S P 298
961 GTTATCTCCCCATCCATCTTTAGGGTATCCACAGCTTACTGTTATCTTGAgaggttaaacgg 1020
299 L S P H P S L G Y P Q L T V I * 313
1021 ttgttattgatgtttgggcttcacgtttgttgattttccatttttgtgaaaagtaaaatt 1080
1081 ctaaataattttttattgtcaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1118

```

Abb. 7.2: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Transkriptionsfaktors **EcaERF2** (cDNA 18F08). Start- und Stopcodon sowie die DNA-Bindungsdomäne sind durch Fettdruck markiert.

1	<u>ACGCGGGGAAGTGGAAAGTGGCGGTGGTGGTGGTTCTTATACTGTTTCATCACCTTCTTCT</u>	60
1	T R G S G S G G G G G S Y T V S S P S S	20
61	TCTTCTTATTCATCTAGTTCTTGGGGTGGTAGTGGTAGTGGACAGAAGAGAGTACGTGAA	120
21	S S Y S S S S W G G S G S G Q K R V R E	40
121	GATGATCAAATTAGTACTGATGGTTATGGTGGTCAGTTTTCTGATTCTGTGAATTTGAGG	180
41	D D Q I S T D G Y G G Q F S D S V N F R	60
181	AATTTTAGAGGATCAACAGAAGAAGTTCGAGGAGCAATAATAACAACATCAACAACAGGA	240
61	N F R G S T E E V R G A I I T T S T T G	80
241	AACATAGAAGCTCCATTAGTAGATTCTGAAAATACATCTTCTTCAAATCAAGAAATAGGA	300
81	N I E A P L V D S E N T S S S N Q E I G	100
301	GGAGGAGGAGAGAGAAGAAGAAAATACAGAGGAGTAAGACAAAGACCATGGGGAAAATGG	360
101	G G G E R R R K Y R G V R Q R P W G K W	120
361	GCAGCTGAAATTAGAGATCCACATAAAGCAGCTAGGGTTTGGTTAGGTACATTTGATACA	420
121	A A E I R D P H K A A R V W L G T F D T	140
421	GCTGAAGCAGCAGCTAGAGCTTATGATGAAGCTGCTTTAAGATTGAGAGGTAACAGAGCA	480
141	A E A A A R A Y D E A A L R F R G N R A	160
481	AAACTTAATTTCCCTGAAAATGTTACTCTTAGACCATCAATCTCTGTTTCTCCATCTACC	540
161	K L N F P E N V T L R P S I S V S P S T	180
541	CATTTCTCCATTTCTAATTCTCCATCAACCCTTTTCTCTGTTTCTCAAATAATCCTTCT	600
181	H F S I S N S P S T L F S V S Q N N P S	200
601	TTCATTCAATCTCCATTAGAGCAGCAACAACAACAGTTGCAGAGAAACAACCTCGGATACT	660
201	F I Q S P L E Q Q Q Q Q L Q R N N S D T	220
661	ATTATTAATACAACAGATTATATTGAATACACTCAATTTCTTCAGAATTCTGAATCAACT	720
221	I I N T T D Y I E Y T Q F L Q N S E S T	240
721	TTTCAATTCAGACAACAACCCATAAATCAATTAGACCAAATGTTTTATAATCCTTCTTTT	780
241	F Q F R Q Q P I N Q L D Q M F Y N P S F	260
781	CTTCCTCCTTTTCAATCTCCCTCACCTCCAATTACTTCTCTATTTCTTCTTCTTCATCT	840
261	L P P F Q S P S P P I T S S I S S S S S	280
841	TCCATTGTTTCTCCATTCTCCACTTTTCTCTCAAATCAACAACAACAACAACAATGGGT	900
281	S I V S P F S T F L S N Q Q Q Q Q Q M G	300
901	AGTTATAATTTCCGACCACCAGAAACTCAAGGTCAAATGGGAATTCGCCGGTCAAACCTT	960
301	S Y N F R P P E T Q G Q M G I R R S N F	320
961	CCGCATTTCCATCCATGGATTCTGGTCATTATCCACCGCCTCCTCCTCCTAGTTGAATC	1020
321	P A F P S M D S G H Y P P P P P P S *	338
1021	cgtttcttagacaaaaagaaaaagcaaattcccccttgtgtccctctcttaaattttatc	1080
1081	ctactgttttttttggcctggttttaacacgtttcttaagttttagtcttgttgattta	1140
1141	tacaaccgtttgagatttagaattttgtgtttttgtggttagagtatatctacccaaaac	1200
1201	gcatgctaattgtggtaaatgaaagtgaaattattaaagatttatcaatgaaagatat	1260
1261	ttacttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1285

Abb. 7.3: cDNA-Sequenz (unvollständig) und abgeleitete Aminosäuresequenz des Transkriptionsfaktors **EcaERF3** (cDNA 13G11). Start- und Stopcodon sowie die DNA-Bindungsdomäne sind durch Fettdruck markiert. Die mittels 5'-RACE erhaltene Nukleotidsequenz ist unterstrichen.

```

1      cacaacacacagagaccaatctctttcaagcaattaccccaacaaactcaaaa      53
54 tcaagaATGGGTTTTAGAATTTAATGAAGAAGTTGATATCAAAGCTCAAGCTCATCTATGG 113
1      M G L E F N E E V D I K A Q A H L W      18
114 AACATAATTTATGGATTTGCTGATTCATTAGTCCTTCGTTCTGCAGTTGAGTTAGGAATT 173
19     N I I Y G F A D S L V L R S A V E L G I      38
174 GCAGATATCATCAAGAACAACAATGGTTCAATCACTGTATCAGAACTTGCATCAAAACTC 233
39     A D I I K N N N G S I T V S E L A S K L      58
234 CCCATCTCAAATGTCAATTCTGATAACTTATATCGAGTTTTAAGGTAAGTACTTAGTACATG 293
59     P I S N V N S D N L Y R V L R Y L V H M      78
294 GGTATCTTAAAGAAACCAAATCCACCATTAATGGAGGAGAAATTAAGAAGCTTTACTCA 353
79     G I L K E T K S T I N G G E I K K L Y S      98
354 CTTGAACCAAGTTGGTAGTTTACTAGTTAAAGATGCAGAAAGAAATATGGTACCCATTGTT 413
99     L E P V G S L L V K D A E R N M V P I V      118
414 TTAGGGATGACCCAACAAGATTTTATGATTCCATGGCATTATATTAAGGAAGGATGGGT 473
119    L G M T Q Q D F M I P W H Y I K E G L G      138
474 GAAGGAAGTACTGCTTTTGAGAAAGGAATGGGTATGACACTTTGGGAATATTTAGAAGGT 533
139    E G S T A F E K G M G M T L W E Y L E G      158
534 CATCCTGAACAAGGTCATTTGTTTAAATGTTGGAATGGAAGGTGAACTAGACTTTTGACT 593
159    H P E Q G H L F N V G M E G E T R L L T      178
594 AAAACCCTAATTGAAAGTTGTAAAGATACTTTTGAAGGTTTGAGTTCTTTGGTTGATGTT 653
179    K T L I E S C K D T F E G L S S L V D V      198
654 GGTGGTGGAAATGGTACAACAATTAAGGCAATTTCTGAAGCATTTCCTCATATAAAATGT 713
199    G G G N G T T I K A I S E A F P H I K C      218
714 AGTCTTTATGATCTTCCTCATGTTGTTGCTGATTCTCATGATCTTCCTAATATTGAAAAG 773
219    S L Y D L P H V V A D S H D L P N I E K      238
774 ATCCCTGGTGATATATTCAAGTTTATACTAATGCTCAAGCTATCTTACTCAAGTTGATC 833
239    I P G D I F K F I P N A Q A I L L K L I      258
834 TTGCATGATTGGAGTGATGAAGACTCTGTCAAGATTCTAAAGAAGTGCAGAGAAGCAGTA 893
259    L H D W S D E D S V K I L K K C R E A V      278
894 CCACAAGATACAGGAAGGGTGATCATAGTAGATGTAGCCCTAGAAGAGGAATCAGAACAT 953
279    P Q D T G R V I I V D V A L E E E S E H      298
954 CCACTAACAAAAACAAGATTGGTTCTTGATGTTGATATGTTAGTTAATACTGGTGGAAAGG 1013
299    P L T K T R L V L D V D M L V N T G G R      318
1014 GAGAGAAGTGAAGATGATTGGGCAAATTACTCAAACCTGCAGGTTTTCGAACTCACAAAG 1073
319    E R S E D D W A K L L K L A G F R T H K      338
1074 ATAAGGCATATTGCTGCTGTTCAATCTGTTATTGAAGCTTTCCCTTAGtatcacaagaac 1133
339    I R H I A A V Q S V I E A F P *      353
1134 aactcagtttcttgatggccaaagagtctagtagtgggactaagtttcctacatatataa 1193
1194 gttcttaaggggtgtttattttcttttcgaatttgctgatttttctttcggatgagat 1253
1254 tcttactctcttgtaaagccttcaaggttggtgtatgtgtgttcttatgtattagtga 1313
1314 aaattgcaacaaaataatgaatgattatcaacggtgtttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1772

```

Abb. 7.4: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der 3'-Hydroxy-N-Methyl-(S)-Coclaurin-4'-O-Methyltransferase (**4'-OMT**, cDNA 05F07). Start- und Stop-codon sind durch Fettdruck markiert.

1	agaataacattcttctccattattagttctattcttcttagagagaaaaatagaaaaaa	60
61	gtagagagagagat ATG GAAATGGAAGGAGCAGACAAGATTGATCAAGCAACCCAAGCCA	120
1	M E M E G A D K I D Q A T Q A	15
121	AAATTTGGAAACACATCTATGGTTTTGCAGAATCCCTAATTTTAAAATCAGCAGTTGAAC	180
16	K I W K H I Y G F A E S L I L K S A V E	35
181	TTGAAATTGCTGATACAATTCATAACCATGGAAAACCCATGACTCTATCCGAGTTAGCTT	240
36	L E I A D T I H N H G K P M T L S E L A	55
241	CAAATACCTGTTCAACCCGTTGACTTAGACCGTCTTTACCGAGTCATGCGTTATTTAG	300
56	S K L P V Q P V D L D R L Y R V M R Y L	75
301	TTCATATGAAGCTTTTCAAGAAACAAGAAGATGAAGAAGAATCAATTAAGTACTCTTTAT	360
76	V H M K L F K K Q E D E E E S I K Y S L	95
361	TACCACCAGCCAAATTTCTGATTAAGGGTTGGGAGAAATCAATGGTGAGTGCAATCTTT	420
96	L P P A K F L I K G W E K S M V S A I L	115
421	TAATCAATGATAAAGATTTTCATGTCTCCATGCCATCATTGAAAGAAGGATTAGTGAATA	480
116	L I N D K D F M S P W H H L K E G L V N	135
481	ATTCTAATGCTTTTGATAAAGCATTAGGGAAAAGTATATGGGATTATATGAGTGCTAATC	540
136	N S N A F D K A L G K S I W D Y M S A N	155
541	CTGATAAAAACAAGTTTTTAATGAAGGTATGGCTTGTGATTCTAGATTAGTATCATCAG	600
156	P D K N K V F N E G M A C D S R L V S S	175
601	CTTTAGTTAATGAGTGTGGAAATATTTTCCAAGGAATTCAAACTCTTGTTGATGTTGGTG	660
176	A L V N E C G N I F Q G I Q T L V D V G	195
661	GTGGAAGTGGAACTGCTGTCAAAGCTGTTTCAAAGGCTTTCCACATATTAAGTGTAGTA	720
196	G G T G T A V K A V S K A F P H I K C S	215
721	TTTATGATCTCCCCCATGTGATTTCTGATTCCCCTGACATTCCTAATATTGTCAAATTTG	780
216	I Y D L P H V I S D S P D I P N I V K I	235
781	AGGGAGATATGTTCAAATCAATTCCAAGTGCTGATGCCATTCTCATGAAGTGCATCCTTC	840
236	E G D M F K S I P S A D A I L M K C I L	255
841	ACGATTGGAACGATGACGAATGCATTGAAATTCATAAAAAATGCAAAGAAGCTGTGCCGA	900
256	H D W N D D E C I E I L K K C K E A V P	275
901	AGGAAGGGGGTAAAGTTATTATCGTCGATATAGTTCTAGACATGGAATCAAACATCCTT	960
276	K E G G K V I I V D I V L D M E S K H P	295
961	ATTCCAAGTTAGACTAACTCTAGATTTGGACATGATGCTCAATACTGAAGGAAAAGAGA	1020
296	Y S K V R L T L D L D M M L N T E G K E	315
1021	GAACAGAAGAAGAATGGAAGAAATTGATTGATGGTGCTGGTTTTGCAAGTTACAAAATCA	1080
316	R T E E E W K K L I D G A G F A S Y K I	335
1081	CTCAAATTTCTGCATTACAATCTGTAATTGAAGCTTTTCCCTTAT TGA ttaggataaaa	1140
336	T Q I S A L Q S V I E A F P Y *	350
1141	aacttactcctatcttttacttttctcaagactctatcttacccttttctatctttt	1200
1201	gttttgaattagtaatgtcataataaagatttgtttctcatgaaggtggaatgagaat	1260
1261	gtgatgatcttcttgcttttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1298

Abb. 7.5: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der (*R,S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (**6-OMT**, cDNA 17E05). Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

```

1 gatccaagtgcacatcttcttccatctctctctctctctctttagatatttttagggctctc 60
61 tagcttgtgtagtttgagcaaatagagATGGTGGATTTGAAAGTGGAGAAGGAAGAGCTC 120
1 M V D L K V E K E E L 11
121 TTGAAGTGCATGGAAGTGGGTTGGTTCTGATGAAGATATTAGGAAGCACATAAGATCC 180
12 L K C M E L G L V P D E D I R K H I R S 31
181 CAATTGGAAAAAAGACTCAAATGGGGTTATAAACCCAACCATGAACAACAACCTTGCTCAA 240
32 Q L E K R L K W G Y K P N H E Q Q L A Q 51
241 CTTCTTGATGTTATTCCTCTCTAAAGAAAATGAAAATTTCAAAGGAATATGAAAGCTTT 300
52 L L D V I H S L K K M K I S K E Y E S F 71
301 GATTTAAGGCTGTATGAAGCACCATTTGACTTCCATAAAATCCAGCTAGGAACACACCTC 360
72 D L R L Y E A P F D F H K I Q L G T H L 91
361 AAAGAAAGTTGTTCACTACTACAAGGATGAATCAACGACATTGGATGAAGCTGAGGGGGCA 420
92 K E S C S Y Y K D E E S T T L D E A E G A 111
421 ATGTTAGATTTTATACCCAAAAGGCTAAAATAGAAGATGGTCAAAGCATACTTGATCTT 480
112 M L D L Y T Q K A K I E D G Q S I L D L 131
481 GGTTGTGGAGTTGGAGCTGTCCTCTCTTCATTGCTAATAAGTATAAAAAATTGTAAGGTC 540
132 G C G V G A V T L F I A N K Y K N C K V 151
541 ACTGGAATTACAAGTTGTCAATGGCAGAAAGACTTTCATTGATAACAAATGCAAGGAATTG 600
152 T G I T S C Q W Q K D F I D N K C K E L 171
601 AACTTAACAAATGTTAGGATTATAATAGGAGATGTGACAGCACACGAAATGGAAGAGACA 660
172 N L T N V R I I I G D V T A H E M E E T 191
661 TTCGATCGTATTTTTGCCATTGAATTGATTGAACACATGAAGAACTACGAATTACTTCTT 720
192 F D R I F A I E L I E H M K N Y E L L L 211
721 AGAAAGATTTCAAATGGATGAAAGATGATGGACTTCTTTTCATTGAACATGTTTGCCAC 780
212 R K I S K W M K D D G L L F I E H V C H 231
781 AAAACCTTGGCTTACCCTTATGAGCCAATTGACGAAGAAGATTGGTTCACTGAGTACGTC 840
232 K T L A Y P Y E P I D E E D W F T E Y V 251
841 TTCCCTGGTGGAACTTTGACACTGTCTTCTGCCTCATTGCTTTTATACTTCCAGGATGAT 900
252 F P G G T L T L S S A S L L L Y F Q D D 271
901 GTCTCAGTTGTTGAACATTCATCTTTGAACGGAAAACATTACTCTCGCGCTCATGGAGAA 960
272 V S V V E H S S L N G K H Y S R A H G E 291
961 TGTTGAAAAATATTGATGCAAACATTGATGAAGTGAAGGTATAATGAAGTCTATAACC 1020
292 W L K N I D A N I D E V K G I M K S I T 311
1021 AAAACAGAGGAAGAAGCAGTGAGGTTGGTTAATTTTTGGAGAATTTTCTGCATGTGTGGA 1080
312 K T E E E A V R L V N F W R I F C M C G 331
1081 ATTGAGATGTTTGGATATAACAATGGTGAAGAATGGATGGTTTCTCATATCCTCCTCAAG 1140
332 I E M F G Y N N G E E W M V S H I L L K 351
1141 AAAAATAAtttctcttaattgatcctcgtattaaaataaagcgagtgggttccaggaga 1200
352 K K * 353
1201 gggcggtcgcaaatctcgaggagataatggtgtccmcaatatgactgtttttatgtttta 1260
1261 aattttttttgtagattgctctacgtattttgatcaaaataaaattagttggtgwa 1320
1321 aagatctcttctattgcctttttggtgtgggaaagtaggagggtaggaaatggcatgatg 1380
1381 agagaagaagcatcattacttttgaaaaacggattcataattggccagaaaaaaaaaaaa 1440
1441 aaaaa 1445

```

Abb. 7.6: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT). Die vollständige cDNA-Sequenz wurde durch 5'- und 3'-RACE von cDNA 21G08 und cDNA 24B04 erhalten. Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

1	aaagttttcattttcttgatagagagaga	29
30	gagagagttttcattttcttgaaggataagatagagagagagagagaagagagagagagggcc	89
90	ATG GATGCGTTGATACAGGTACCATATAATGCTACAGTAAAAGTTATGCTGAGTTCACTT	149
1	M D A L I Q V P Y N A T V K V M L S S L	20
150	GAGAGAAATCTATTACCAGATGTTGTGATTAGGAACTCACTAAATTGTTATTAGCAAGT	209
21	E R N L L P D V V I R K L T K L L L A S	40
210	CGACTTCGATTGGGTTATAAACCCACTTCAGATCTTCAACTCTCTGATCTTCTTCAATTT	269
41	R L R L G Y K P T S D L Q L S D L L Q F	60
270	CTTCACTCATTTNGAAGAGATGCCAATAGCAATCAAACTGATACAGCTAAAACCCAACAT	329
61	L H S F/L E E M P I A I K T D T A K T Q H	80
330	TATGAATTACCCACTTCTTTTTTCAATCTTGTTCTTGGTTCCACATATGAAATACAGCTGT	389
81	Y E L P T S F F N L V L G S H M K Y S C	100
390	TGTTACTTCACTGATGAGTCTAAGAgCTTGGAAAGATGCAGAAGAAGCAATGTTGGAAGCTT	449
101	C Y F T D E S K S L E D A E E A M L E L	120
450	TACTGTGAGAGAGCACAAATAAAAGATGGGCATACTGTTCTTGATGTTGGGTGTGGATGG	509
121	Y C E R A Q I K D G H T V L D V G C G W	140
510	GGATCCCTTTCTTTTATACATTGCACAAAAGTATAGCAATTGCAAGATTACAGGGATATGC	569
141	G S L S L Y I A Q K Y S N C K I T G I C	160
570	AATTCGGTAACTCAGAAAGCACATATTGAAGAACAGTCCAGGGAGCTGAATTTGAATAAT	629
161	N S V T Q K A H I E E Q S R E L N L N N	180
630	GTGGAGATCATTGTAGCGGATATTAGCACACATGAGATGGAGGCCTCTTATGATAGGATT	689
181	V E I I V A D I S T H E M E A S Y D R I	200
690	CTATCAATTGAGATGTTTGGAGCACATGAAGAAGTATAAGGAGCTTCTTAAGAAGATATCT	749
201	L S I E M F E H M K N Y K E L L K K I S	220
750	AACTGGATGAAACAAGATAGCCTCCTTTTTGTTTCATCACTTTTGTCCACAAAGCATTGCT	809
221	N W M K Q D S L L F V H H F C H K A F A	240
810	TACCATTTTGGAGATACAAGTGAAGATGACTGGATAACTAGATACTTCTTCACTGGAGGG	869
241	Y H F E D T S E D D W I T R Y F F T G G	260
870	ACAATGCCATCTGCTAATCTACTTCTTTACTTCCAGGACGATGTTTCTGTTGTCAACCAT	929
261	T M P S A N L L L Y F Q D D V S V V N H	280
930	TGGCTAGTAAATGGGAAGCATTACGCACAAACAAGTGAAGAGTGGCTTAAAAGAATGGAC	989
281	W L V N G K H Y A Q T S E E W L K R M D	300
990	AAAACTTGAAGTCTATAAAGCCGATAATGGAGTCAACTTACGGTAAGGAATCAGCAGTG	1049
301	K N L N S I K P I M E S T Y G K E S A V	320
1050	AAATGGACTGTGTATTGGCGAACATTTTTTATCTCTGTGGCGGAGTTATTTGGATACAAC	1109
321	K W T V Y W R T F F I S V A E L F G Y N	340
1110	AATGGAGAAGAATGGATGGTTGCTCATTTTTCTATTCAAGAAAAA TAG gaatttgggatt	1169
341	N G E E W M V A H F L F K K K *	355
1170	tagtattttcatcattgtccttgatttttcggtcatgttttgcatttccgatacattgtta	1229
1230	agagacttaatttgtatcggccttaagctatctaagtttttgtgcttctgaacacatac	1289
1290	tcttatatttttaatttcgtgaccaagctcttttgtttccattagatagttaatcacga	1349
1350	ctaataaacatgaattttgttacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1391

Abb. 7.7: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz einer putativen *N*-Methyltransferase (NMT, cDNA 04E05). Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

Anhang

1	aaataatctctcatttccttcatccttttgatcagctctacaaaatattaaa ATG GATTCC	60
1	M D S	3
61	TTAATCCTTACCAATTGGTTTCCGATATCAATTGCTTCTGTTTTAACCTAGTTTTCTT	120
4	L I L T N W F P I S I A S V L T L V F L	23
121	TACAAAGTCTTACTTTCCTCAAGAACTCTTAAAGATAAGAAGATTAAGACTTCACCCATG	180
24	Y K V L L S S R T L K D K K I K T S P M	43
181	GCAAATGGTGCATGGCCAATTCTTGGTCATCTCCATCTCTTTGGTTCAGGTGAATTACCT	240
44	A N G A W P I L G H L H L F G S G E L P	63
241	CATAAAATGCTAGCTACCATTGGCTGACAAGTATGGCTCAGCCTTCAGGATGAAGTTTGGT	300
64	H K M L A T M A D K Y G S A F R M K F G	83
301	AGACACACAACCTCTAGTTGTGAGTGATACCCGATCGTTAAAGAATGTTTCACTACCAAC	360
84	R H T T L V V S D T R I V K E C F T T N	103
361	GATACCCTCTTCTCCAACCGTCCTTCCACTAAAGCTTTTCaACTCATGACTTACGATAAT	420
104	D T L F S N R P S T K A F Q L M T Y D N	123
421	GAGTCGGTTGCCTTCACACCTTATGGTCCTTACTGGCGTGAGCTTAGAAAGATATCCACT	480
124	E S V A F T P Y G P Y W R E L R K I S T	143
481	CTTAAACTTCTATCCAACCATCGTCTCCAAGCCATCAAGGACGTTAGAGCCTCGGAGGTA	540
144	L K L L S N H R L Q A I K D V R A S E V	163
541	AACGTATGCTTCAAAGCTTATACGATCAGTGTA AAAATCCAAGTGGAGCTCCTATTTTG	600
164	N V C F K S L Y D Q C K N P S G A P I L	183
601	ATTGATATGAAGAAATGGTTCGAAGAGGTATCGAACAACGTGGTGATGAGGGTAATTGTT	660
184	I D M K K W F E E V S N N V V M R V I V	203
661	GGGAGACAAAATTCGGGTCTAAGATTGTGCAAGGTGAGGAGGAAGCTATGCAATACAAG	720
204	G R Q N F G S K I V Q G E E E A M Q Y K	223
721	AAGGTCAATGGATGAGCTCTTGCCTTGTCTAGTTTGTCTATGTTCTCAGATTTTGCTCCT	780
224	K V M D E L L R L A S L M F S D F A P	243
781	TTACTTAGTTTCTTGGACATCTTCCAAGCAACTTGAGTGCCATGAAACGAAACGCCAAG	840
244	L L S F L D I F Q G N L S A M K R N A K	263
841	AAGGTTGACGCAATCCTCGAGAACTGGTTGGAAGAGCATCGGAAGAAGAAGAACTCAGTT	900
264	K V D A I L E N W L E E H R K K K N S V	283
901	GCTGAAAGCGAGCAAGATTTTCATGGATGTTATGTTGTCAATTGCCAACGAGAGCAAGTTG	960
284	A E S E Q D F M D V M L S I A N E S K L	303
961	TCTGGTCACGATGCCGATACTGTCATTAAGCTACTTGCCTAGCAATGATTATGGGTGGA	1020
304	S G H D A D T V I K A T C L A M I M G G	323
1021	ACAGACACTACTGCTGTGAGTCTAACATGGATCATTCTTTTATTAATGAACAATCGCCAT	1080
324	T D T T A V S L T W I I S L L M N N R H	343
1081	GCTTTGAAGAAAGCTCGAGAAGAATTAGATGCACTAGTAGGAAAGGACAGACAAGTTGAA	1140
344	A L K K A R E E L D A L V G K D R Q V E	363
1141	GATTCAGATTTGAAGAATTTAGTATACATGAATGCTATCGTTAAGGAAACAATGAGAATG	1200
364	D S D L K N L V Y M N A I V K E T M R M	383
1201	TACCCGTTAGGTACTCTTCTTGAACGTGATACTAAGGAGGACTGTGAGATCGGCGGATTC	1260
384	Y P L G T L L E R D T K E D C E I G G F	403
1261	CATGTCAAAGGCGGGACGAGGTTGCTAGTGAATGTGTGGAAGTTGCAACGAGAGCCAAAT	1320
404	H V K G G T R L L V N V W K L Q R D P N	423
1321	GTATGGGTTGATCCAACAGAATTTAGACCTGAAAGATTTCTAACCGAGAATGCAGATATA	1380
424	V W V D P T E F R P E R F L T E N A D I	443
1381	GATGTTGGAGGTCAACATTTTCGAGTTACTACCATTTGGAGCAGGAAGAAGGGTGTGTCCT	1440
444	D V G G Q H F E L L P F G A G R R V C P	463
1441	GGGGTGTGCTTCGCACTACAATTTATGCATTTAGTACTTGTCTCGTCTCATCCATGGATAC	1500
464	G V S F A L Q F M H L V L A R L I H G Y	483
1501	GATTTGAATACTCTAAACGAAGAAAATGTGGATCTAACTGAAAGCCCAGAAGGACATGTG	1560
484	D L N T L N E E N V D L T E S P E G H V	503
1561	AACCACAAAGCATCGCCTCTTGATCTCATCCTCACCCCTCGTCTTCATTCTAGTCTTTAT	1620
504	N H K A S P L D L I L T P R L H S S L Y	523
1621	GACTAT TAA cttcttcactctttctatgtattaattatcttttatatgtttcaactat	1680
524	D Y *	525
1681	ggtcatctttcaaaaaaaaaaactatggtcatcttcaattataaagtatggtcgtcagaa	1740
1741	ttattggtggtgttttaattggtcataacttttgtaaggtgagataattattgtatgttt	1800
1801	atcaaattcaataaaaattatgtttgggtgttcaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1849

Abb. 7.8: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Cytochrom-P450-Enzyms **CYP82N1** (cDNA 26H09). Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

Anhang

1	caatcttcctatctttcaaattctccttacagttattggtacagatatcagtactaaaag	60
61	aagaaagaaaaaac ATGGATT CCTTCATGCTTGCTTATTTGTTTCCAATTTTCAGTTGCT	120
1	M D S F M L A Y L F P I S V A	15
121	TCTATTATTGCTTTTGTTCCTCTACAATCTCTTTTCTTCAAGAACTCTTCAAATAAG	180
16	S I I A F V F L Y N L F S S R T L Q N K	35
181	AAGATTAGGACAGCACCCATGGCAATGGGTGCTTGGCCTGTTCTTGGTCATCTCCATCTC	240
36	K I R T A P M A M G A W P V L G H L H L	55
241	TTTGGTTCTGGTGAATTGCCTCATAAAATGCTAGCTTCCATGGCTGACAAGTATGGCTCA	300
56	F G S G E L P H K M L A S M A D K Y G S	75
301	GCCTTCAGGATGAAGTTTGGTAAACACACAACACTAGTTGTGAGTGATACCCGTATCGTT	360
76	A F R M K F G K H T T L V V S D T R I V	95
361	AAAGAATGTTTCACTACCAACGATACCCCTCTTCTCTAACCGTCCTTCCACTAAAGCTTTT	420
96	K E C F T T N D T L F S N R P S T K A F	115
421	CAACTCATGACTTACGATAATGAGTCGGTTGCCTTTACACCTTACGGTCCTTACTGGCGT	480
116	Q L M T Y D N E S V A F T P Y G P Y W R	135
481	GAGATTAGAAAGATATCCACTCTTAAACTTCTATCCAACCATCGTCTCCAAGCCATCAAG	540
136	E I R K I S T L K L L S N H R L Q A I K	155
541	GACGTAAGAGCCTCGGAGGTAAACGTCTGCTTCAAACCTTATACGACCAGTGTAAAGAT	600
156	D V R A S E V N V C F K T L Y D Q C K N	175
601	CCAAGTGGATCAGCTCCTGTTTTGATTGATATGAAGAAATGGTTCGAAGAGGTCTCGAAC	660
176	P S G S A P V L I D M K K W F E E V S N	195
661	AACGTGGTGATGAGGGTAATTGTGGGGAGACAAAACCTTTGGGTCTAAGATTGTGCAAGGT	720
196	N V V M R V I V G R Q N F G S K I V Q G	215
721	GAGGAGGAAGCTATCCATTACAAGAAGGTCATGGATGAGCTCTTACGTCTCGCTAGCTTG	780
216	E E E A I H Y K K V M D E L L R L A S L	235
781	TCTATGTTCTCGGATTTTGTCTCTTACTTGTGTTTTCGTGGATATCTTTCAAGAACTTG	840
236	S M F S D F A P L L G F V D I F Q G N L	255
841	AGTGCCATGAAACGAAACGCCAAGAAGGTGGATGCAATCCTCGAGAAGTGGTTGGAAGAG	900
256	S A M K R N A K K V D A I L E N W L E E	275
901	CATCGCAAGAAGAAGAACTCAGTTGCTGAAAGCGAGCAAGATTTTCATGGATGTTATGTTG	960
276	H R K K K N S V A E S E Q D F M D V M L	295
961	TCGATTGTTGAGGAGAGCAAGTTGTCTGGTCACGATGCTGATACCGTAATTAAGGCTACT	1020
296	S I V E E S K L S G H D A D T V I K A T	315
1021	TGTCTAGCCATGATCATGGGCGGAACAGATAACCACAGCAGTGAGTCTAACATGGATCATT	1080
316	C L A M I M G G T D T T A V S L T W I I	335
1081	TCTTTATTAATGAATAATCGTCACGCTTTGAAGAAAGCTCGAGAAGAGTTAGATGCACTA	1140
336	S L L M N N R H A L K K A R E E L D A L	355
1141	GTAGGAAAGGACAGACAAGTTGAAGATTCGGATTTGAAGAATTTAGTTTACATGAATGCT	1200
356	V G K D R Q V E D S D L K N L V Y M N A	375
1201	ATTGTAAAGAAACAATGAGAATGTACCCATTAGGTACTCTTCTCGAACGCGAGACTAAG	1260
376	I V K E T M R M Y P L G T L L E R E T K	395
1261	GAGGATTGTGAGATCGACGGTTTCATGTCAAAGTGGGACTAGGTTGCTAGTGAATGTG	1320
396	E D C E I D G E F H V K G G T R L L V N A	415
1321	TGGAAGTTGCAACGAGACCCAAATGATGGGTTGATCCAACAGAATTTAGACCCGAAAGA	1380
416	W K L Q R D P N V W V D P T E F R P E R	435
1381	TTTCTAACGGAGAATGCGGATATAGATGTTGGAGGTCAGCATTTTGGAGTTGCTACCATTT	1440
436	F L T E N A D I D V G G Q H F E L L P F	455
1441	GGAGCAGGACGAAGGGTGTGCCCTGGGGTGTGCTTTGCACTACAATTCATGCATTTAGTA	1500
456	G A G R R V C P G V S F A L Q F M H L V	475
1501	CTTGCTCGCCTCATCCATGGATACGATTTGAATACTCTAAACGAAGAAAATGTGGATCTG	1560
476	L A R L I H G Y D L N T L N E E N V D L	495
1561	ACGGAGAGCCCAGAAGGACATGTGAACCACAAAGCATCGCCTCTTGATCTCATCCTCACC	1620
496	T E S P E G H V N H K A S P L D L I L T	515
1621	CCTCGTCTACATTACAAGTTGTACGA ATAG ttttatgatggtttcttttttcattttttt	1680
516	P R L H Y K L Y E *	524
1681	caaattttaaatcaaagatcggtcaattgcaaaatctgttgtaacttacaagataaaa	1740
1741	ataaatatattcgtgtaatatatacaaatgaaatctttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1798

Abb.7.9: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Cytochrom-P450-Enzyms **CYP82N2** (cDNA 08B11). Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

Anhang

1	ctcatttttgttttgatcttttgcctagcattatagagta ATGGGTCTTTCATTTGATCTT	60
1		
		M G L S F D L
61	TCTTCTTGTAATAACTTTCTTCAATTTCTCAAACCCACTATTCTCATTGGCCTCTTTGGT	120
8	S S C N N F L Q F S K P T I L I G L F G	27
121	TTACTAGTTTACCTTTTACTAGCAAATCTTCGAAAACGAATATCACGAAAAAATGAGGCA	180
28	L L V Y L L L A N L R K R I S R K N E A	47
181	CCCGAAGTGGAAGGTGGGTGGCCTATCATAGGTCATCTTCATCATTTTCATGGGTGGGAAA	240
48	P E V E G G W P I I G H L H H F M G G K	67
241	AACAAGCTACTCCATGTAGCATTGGGAGCTTGGGCTGATAAGTATGGACCAGTCTATACT	300
68	N K L L H V A F G A W A D K Y G P V Y T	87
301	CTAAGGATGGGTCTGAATAAAGTACTAGTTGTGAATAGTGCAGAAGTAGCAAAAAGTGT	360
88	L R M G L N K V L V V N S A E V A K E C	107
361	TCAACTACTAATGACATGCTTTTTATGGCTCGTCCATACCGAGTAGCCTCTGAGATCATG	420
108	S T T N D M L F M A R P Y R V A S E I M	127
421	TGTTATGGATACGCGATGTTTCCTATCGCTCCTTATGGACCATTCTATCTCAAATGCGA	480
128	C Y G Y A M F P I A P Y G P F Y L K M R	147
481	AAAATGGTCACTCAAGAGCTTCTCTCAAATAGTAGGGTTGATTCTCTAAAACATGTGTGG	540
148	K M V T Q E L L S N S R V D S L K H V W	167
541	GGTTCGAGATAAAAACTGCTATTCAAGAACTTACAATAAAGTATCGTCAACTAAAGGT	600
168	G S E I K T A I Q E L H N K V S S T K G	187
601	GGTGTCCAATTTCAATGGACATGAAGGGATGGGTTCCAATTTAACGTTCCGAACGGCT	660
188	G G P I S M D M K G W V S N L T F R T A	207
661	ATGAAGGTGATTTGTGGTGGTGTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT	720
208	M K V I C G G V D G G G G G G G A A	227
721	GCTGCTACTTCTCCTGCAACTAGTATTGGAGAACATAAATTATGATGAAGTTGGAAGTTTT	780
228	A A T S P A T S I G E H N Y D E V G S F	247
781	CAAAAAGCATTGAAAGAATTCTTTGTGTACTAGGAGAAATTAGGATTTCTGATGTGATA	840
248	Q K A L K E F F V L L G E I R I S D V I	267
841	CCGTTCTAGGGTGGTTAGATATGCGAACCGGGTACGTGGAAAAGATGAAGGACAATGGA	900
268	P F L G W L D M R T G Y V E K M K D N G	287
901	AATTTTCTAGACAATTTAATGGAGGAAATGCTGGAAGAACACAAAAGGAAGAGAAGATCA	960
288	N F L D N L M E E M L E E H K R K R R S	307
961	CTAAGTGAAGAAGAGGAAAAAGATGGTTGTTATGTGGAGCAAGATTTTCATGGATGTAATG	1020
308	L S E E E E K D G C Y V E Q D F M D V M	327
1021	ATATCGAAACTTAATGATCCAAAGCTTCTGTCTGATATTATGACTCTGATACTATCAACAAG	1080
328	I S K L N D P K L L S Y Y D S D T I N K	347
1081	TCTACTTGCTGACTCTAATTTTGGAGTGGGAGTGGAGACAACATATGGTTAGTATTGTTGG	1140
348	S T C L T L I L S G S E T T M V S I V W	367
1141	GCTTTAGCGCTACTAGTCAGTCATCCAGACGTGTTAAAGAAAGCGCAAGATGAGTTGGAT	1200
368	A L A L L V S H P D V L K K A Q D E L D	387
1201	ACGCATGTTGGTCGGGAAAGACAGGTAGACGAATCTGATATCAAAGATTTGGTATACCTC	1260
388	T H V G R E R Q V D E S D I K D L V Y L	407
1261	CAAGCTGTAGTTAAGGAAGCATTGAGACTATTTCCACCGCTCCACTTTCAACTCCACGC	1320
408	Q A V V K E A L R L F P P A P L S T P R	427
1321	GTTGCAACAGAAGATTGTGTCTGATCAGGATATCATGTCCCTGCAGGGACCCAACCTTTTT	1380
428	V A T E D C V V S G Y H V P A G T Q L F	447
1381	GTAATACTTGGAAAGATTCAACGTAACCCGGAAGTATGGCCTGACCCATCAGAGTTTAGA	1440
448	V N T W K I Q R N P E V W P D P S E F R	467
1441	CCTGAGAGATTTTTCAACCCACAAGGATTTCCACGTTAGAGGTCTACATTATGACCTC	1500
468	P E R F F T T H K D F D V R G L H Y D L	487
1501	CACCCTTTCCGGTCTGGTAGAAGAGCATGTCCAGGTGCTGGCTTCGCCCTTCAAGTGGTG	1560
488	H P F G S G R R A C P G A G F A L Q V V	507
1561	CATCTAACCCCTAGCTTCTCTATTACATGGGTTTCGAGATTAAAAACCCATCGGATGAACCC	1620
508	H L T L A S L L H G F E I K N P S D E P	527
1621	ATTGATATGACTGAGAGTCCAGGTGTGACTAACTTGAAAGCAACCCCACTGAAAGTCCCTC	1680
528	I D M T E S P G V T N L K A T P L K V L	547
1681	CTGACCCCTCGCCTCTCTCTAAAGAAGTTTTAT TAA gaaaaaagaataaatgtgtaagt	1740
548	L T P R L F S K E V Y *	558
1741	tctttatgaacaatttgtattcgatatgaatttgattatcgatggtaatttatggtatag	1800
1801	aacaataagaccagtttaaggtccaattatcatcatcgataatgttatcttagaagtgg	1860
1861	tttggttggtgtaccatgtgtaataaatatgaaagtttcttgggaacaatttgtgattgat	1920
1921	atgaatttgagatcattagtaaaaaaaaaaaaaaaaa	1957

Abb. 7.10: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Cytochrom-P450-Enzyms **CYP82P1** (cDNA 23D07). Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

Anhang

1		14
15	ATG GAGGAGATGAAGATTTTGGATGATGAATAACCCATGGATTCTTACTGCTACAGCTACA	74
1	M E E M K I L M M N N P W I L T A T A T	20
75	ACTCTACTCATTTCCATCTTCTTGTGTTTTTCCACAAGAAAATCATCAAAAATGGTTTGGCCG	134
21	T L L I S I F L F F T R K S S K M V W P	40
135	GCCGGCCCTAAAACCTTACCCATCATTGGAAATATGCATCTTCTTGGTGGAACTGCACTT	194
41	A G P K T L P I I G N M H L L G G T A L	60
195	CAAGTTGTCTTACATAACCTTGCCAAAGTTCATGGCAGCGTTATGACAATTTGGATTGGA	254
61	Q V V L H N L A K V H G S V M T I W I G	80
255	AGTTGGAGACCTGTTATCGTTGTTTCCGACATCGAGCGGGCTTGGGAAGTCTCGTTAAC	314
81	S W R P V I V V S D I E R A W E V L V N	100
315	AAATCATCGGACTACTCGGCCCGTGACATGCCTGATATTACCAAGATTATTTCTGCAGAT	374
101	K S S D Y S A R D M P D I T K I I S A D	120
375	TGGAAAACAATTTCAACTTCTGATTCTGGTCTCACTGGACTAATTTAAGAAAAGGTCTT	434
121	W K T I S T S D S G P H W T N L R K G L	140
435	CAAAATGTAGCTTTTATCACCTACAATCTTGCAGCTCAATTTCAATTTCAAGAGTTGCA	494
141	Q N V A F I T S Q S C S S I S I P R V A	160
495	GCTCAATTTCAATTTCCAGCAGAAAGATATGACTAAAATGATTCAAATCTTGAAGAAGAA	554
161	A Q F Q F Q Q K D M T K M I Q T L E E E	180
555	GCAAGAAACAACAATGGGATTGTTAAACCACTTGATCATATGAAGAAAGCTACCCTAAGA	614
181	A R N N N G I V K P L D H M K K A T L R	200
615	TTAATAAGTAGATTAGTTTTTCGGTCAAGATTTTAATAACGATAAGTACGTAGACGATATG	674
201	L I S R L V F G Q D F N N D K Y V D D M	220
675	CATCTTGCTATCGAAGAATTGATCCGGGTAAGTGGTTATGCTCGTCTAGCCGAAGCTTTT	734
221	H L A I E E L I R V S G Y A R L A E A F	240
735	TACTATGCGAAGTACTTACCTAGTCATAAAAAGCCGTTTCGAGAAGTAGAAGAAGCTCAG	794
241	Y Y A K Y L P S H K K A V R E V E E A Q	260
795	CGAAGAGTTCAAAACTTGGTAAGTCCATTTCTTTTCGTTAAATCCTCCTACTAATACTTAC	854
261	R R V Q N L V S P F L S L N P P T N T Y	280
855	TTACATTTTCTTCGATCCCAAAAATACGACGATGAAGTCATTATTTTTCGCTATATTCGAA	914
281	L H F L R S Q K Y D D E V I I F A I F E	300
915	GCTTATCTTTTGGGTGTGGATAGTACTTCTTTAACTACAGCATGGGCCTTGCATTTTTTA	974
301	A Y L L G V D S T S L T T A W A L A F L	320
975	ATAAGAGAACCAAATGTTCAAGAAAACCTTTACCAAGAAGTGGAGAGTTTCGCATCCAAA	1034
321	I R E P N V Q E K L Y Q E L E S F A S K	340
1035	AATGATAGAAAGATCTTGAAGTTGAAGATATAAACAAGTTACAATATTTGCAAGCTGTG	1094
341	N D R K I L K V E D I N K L Q Y L Q A V	360
1095	ATTAAAGAGACAATGAGGATGAAACCTATTGCTCCACTAGCAATTCCTCATAAAGCTTGT	1154
361	I K E T M R M K P I A P L A I P H K A C	380
1155	AGAGATACTTCATTAATGGGGAAGAAAATTGATAAAGGAAGTGGGTTATGGTTAATATA	1214
381	R D T S L M G K K I D K G T R V M V N I	400
1215	TTTGCTTTACACCATAACAAGAATGTTTTTAATGATCCATTCAAGTTTATGCCTGAGAGA	1274
401	F A L H H N K N V F N D P F K F M P E R	420
1275	TTCATGAAAGTTGATAGTCAAGATGCTAATGGGAAAGCAATGGAGCAATCACTTTTGCCA	1334
421	F M K V D S Q D A N G K A M E Q S L L P	440
1335	TTTAGTGCAGGTATGAGAATTTGTGCAGGAATGGAGTTAGGAAAACCTTCAATTTAGTTTT	1394
441	F S A G M R I C A G M E L G K L Q F S F	460
1395	GCACTTGCTAATCTTGCTATGCATTTAAATGGTCTTGTGTTGCTGATGGTGTCTTCTCCT	1454
461	A L A N L A Y A F K W S C V A D G V L P	480
1455	GACATGAGTGATCAATTAGGGTTTTGTTCTTTTGGATGAAGACCCCACTCGAAGCTCGAATT	1514
481	D M S D Q L G F V L L M K T P L E A R I	500
1515	AATCGTCGTAAT TAA tcacttaaccgtgctcgtgggtaacagggcctttgggtttaatca	1574
501	N R R N *	504
1575	acatttgggttaataagtctacttagtacttttaaatatggttcttcttgggtctttaaatat	1634
1635	agtttgggtggtggttacttgggtgtaaatatcttcttgggtatggttacttgggtgaaagggaaa	1694
1695	aaaaaaaaaa	1705

Abb.7.11: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen (S)-Stylopin-Synthase **CYP719A2** (cDNA 13F06). Start- und Stopcodon sowie die einzige unterschiedliche Aminosäure (344 K an Stelle von R) zu CYP719A2 (GenBank BAD98250) sind durch Fettdruck markiert.

1	gaaaatccttagaaatcaacaaggtagaaagaaagagacaagtgagatattataggaacc	60
61	ttaaaa ATG GAGGAAAGCCTTTGGGTAGTCACAGCTACAGTTGTAGTAGTATTTGCAATA	120
1	M E E S L W V V T A T V V V V F A I	18
121	GCAAAATTATTGAAGAAATCATCTTCTATCTCAACAATGGAATGGCCAAAAGGTCCCAAA	180
19	A K L L K K S S S I S T M E W P K G P K	38
181	AAACTACCCATAATTGGAAACCTTCATCAACTAGGTGGAGAAGCATTTCATGTTGTTTTG	240
39	K L P I I G N L H Q L G G E A F H V V L	58
241	GCTAATCTAGCAAAAATTCATGGAAGTGTGATGACAATTTGGGTAGGGGCTTGGAGACCG	300
59	A N L A K I H G T V M T I W V G A W R P	78
301	ATGATCGTCATAAGTGACATTGATAAAGCTTGGGAAGTTCTTGTTAACAAATCATCAGAT	360
79	M I V I S D I D K A W E V L V N K S S D	98
361	TATGCAGGAAGAGATTTTCTGAAATTACAAAGATCATTTCAGCAAATTGGAAAAATATC	420
99	Y A G R D F P E I T K I I S A N W K N I	118
421	TCATGTTCTGATTCTGGTCCATTTTGGCAAAACCTAAGAAAAGGACTTCAAGGTGGTGCA	480
119	S C S D S G P F W Q N L R K G L Q G G A	138
481	TTAGCTCCATTAATGTTATATCTCAATATCAATTACAAGAGAGAGACATGAAAAATTTA	540
139	L A P L N V I S Q Y Q L Q E R D M K N L	158
541	ATCACATCCATGCAAGAAAAAGCATCAAAAAACAATGGTATTTTGAAGCCTCTTGATTAT	600
159	I T S M Q E K A S K N N G I L K P L D Y	178
601	CTTAAAGAAGAGACAATTCGGTTACTTAGCCGTCTCATTTTCGGTCAAAGTTTAAACGAC	660
179	L K E E T I R L L S R L I F G Q S F N D	198
661	GAAAACCTTTGTTAAAGGTGTGCATCTTGCTCTTGACGATTTGGTACGTATAAGTGGATAT	720
199	E N F V K G V H L A L D D L V R I S G Y	218
721	GCTAGTCTTGCGGATGCGTTCAAATTTTGTGAAAATTTACCAAGTCACAAGAAATCAATT	780
219	A S L A D A F K F C E N L P S H K K S I	238
781	AGAGAAGTTCATGAAGTGAATGAAAGAGTTGTTAACTTGGTAAAGCCCTATCTTGTTAAA	840
239	R E V H E V N E R V V N L V K P Y L V K	258
841	AACCCTCTACAAATACTTACTTATATTTCTTGAACTCTCAAAAGTTTAGTGATGAAGTT	900
259	N P P T N T Y L Y F L N S Q K F S D E V	278
901	ATAATTTCTGCGGTTTTAGAAGTTTATGATCTTGGTGTGATAGTACTGCATCAACCGCA	960
279	I I S A V L E V Y D L G V D S T A S T A	298
961	GTATGGGCATTAACATTTTTTAGTACGTGAACCTCGCGTTCAAGAGAACTATATAAAGAA	1020
299	V W A L T F L V R E P R V Q E K L Y K E	318
1021	ATCATAGACTTAACAGGTGGAGAAAGATCGGTGAAAGTGGAGGATGTGAGCAAGTTGCCG	1080
319	I I D L T G G E R S V K V E D V S K L P	338
1081	TATTTACAGGCCGTGATGAAGGAGACAATGAGGATGAAACCCATTGCTCCAATGGCGATT	1140
339	Y L Q A V M K E T M R M K P I A P M A I	358
1141	CCCATAAGACTTCAAGAGATACCTCATTGATGGGGAAGAAAGTTAATAAGGGTACAAGT	1200
359	P H K T S R D T S L M G K K V N K G T S	378
1201	ATAATGGTGAATCTTTATGCTATTCATCATAACCCTAAAGTTTTTCTGAACCATATAAG	1260
379	I M V N L Y A I H H N P K V F P E P Y K	398
1261	TTTATACCAGAGAGATTCTTACAAGGACAAGAGAGTAAGTATGGAGATATTAAGGAAATG	1320
399	F I P E R F L Q G Q E S K Y G D I K E M	418
1321	GAGCAATCACTTTTGCCATTTAGTGCTGGAATGAGAATTTGTGCAGGAATGGAATTGGGG	1380
419	E Q S L L P F S A G M R I C A G M E L L G	438
1381	AAACTTCAATATGGATTTAGTTTGGCAAGTCTAGTGGGAAGCATTTAAGTGGACTTGTGCT	1440
439	K L Q Y G F S L A S L V E A F K W T C A	458
1441	GTTGATGGAAAATTGCCTGATCTTAGTGAGGATCATTGCTTTATTTTGTTAATGAAGAAC	1500
459	V D G K L P D L S E D H C F I L L M K N	478
1501	CCACTTGAAGCAAGAATTACTCCTCGCACCCAATTG TAG gtgaagaattaagtgaaatgg	1560
479	P L E A R I T P R T Q L *	490
1561	catgtggtgctagcatctattaatcatcctggtgTTTTTcaatgtaacctttctTTTTTct	1620
1621	TTTTTTTTTgaagctTTTTGGGTCTTTTTTcttTgtctTTTggtactgggaaatgTtTgtT	1680
1681	gttaatgtTgtTgtTtaatgtataaccaatattgtTgtaatgggatgatcaatgaagggga	1740
1741	ccagcctTgtgggctcatagtggtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1785

Abb. 7.12: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen (S)-Cheilanthifolin-Synthase **CYP719A5** (cDNA 02E03). Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

7.2 Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer

Tab. 7.1: Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer

Primer	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
pZL1-T7 pZL1-sp6	AGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G ATT TAG GTG ACA CTA TAG	EST-Sequenzierung aus der cDNA-Bibliothek
pZL1-F1 pZL1-R1	TCG ACC CAC GCG TCC G CGT AAG CTT GGA TCC TCT AGA G	Reamplifizierung der cDNAs
pBKIIISK-SK pBKIIISK-T7	CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Sequenzierung und Reamplifizierung der FGP- cDNAs
M13 forward (-20) M13 reverse	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAG GAA ACA GCT ATG ACC	Reamplifizierung der cDNAs von BBE1 und CYP80B1, Sequenzierung der Promotorfragmente
CYP80B1v1/2-5' CYP80B1v1/2-3'	TCT AGA TGG AGG TTG TCA CAG TAG C CCT AGG AGA AGA TCA AAC CCT TGA T	RT-PCR zur Klonierung von CYP80B1
dT20VN	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV N	reverse Transkription
05F07-445F 05F07-for1 05F07-for2	CAT GGC ATT ATA TTA AGG AAG CCA TGG CAT TAT ATT AAG GAA G AAG AGG AAT CAG AAC ATC CAC	Sequenzierung der 4'-OMT
17E05-for1 17E05-for1b 17E05-rev1	AAG ATG AAG AAG AAT CAA TTA AGT ACT C GGA GAA ATC AAT GGT GAG TGC CTT CAG TAT TGA GCA TCA TGT CC	Sequenzierung der 6-OMT
21G08-for1 21G08-for2 24B04-for1 24B04-for2	CGA CAT TGG ATG AAG CTG AG AGG ATG ATG TCT CAG TTG TTG GAT TTA AGG CTG TAT GAA GCA C CCT TGG CTT ACC CTT ATG AG	Sequenzierung der CNMT
04E05-for1 04E05-for2	CAG CTG TTG TTA CTT CAC TGA TG ATG CCA TCT GCT AAT CTA CTT C	Sequenzierung der NMT
13F06-for2 13F06-for3 13F06-for4 13F06-rev1 13F06-rev2 13F06-rev3 13F06-rev4	AAG AAA AGG TCT TCA AAA TGT AGC GAA GAA GCT CAG CGA AGA G TGA GGA TGA AAC CTA TTG CTC CCT AAC TCC ATT CCT GCA C CAA GTG CCC ATG CTG TAG GAT GCA TAT CGT CTA CGT ACT TAT C CGA TAA CAG GTC TCC AAC TTC	Sequenzierung von CYP719A2
02E03-for2 02E03-for3 02E03-for4 02E03-rev1 02E03-rev2 02E03-rev3 02E03-rev4	GAA GTT CTT GTT AAC AAA TCA TCA G AAC TCT CAA AAG TTT AGT GAT GAA G TGA GAA TTT GTG CAG GAA TG CAC TTA AAT GCT TCC ACT AGA C AAC GCG AGG TTC ACG TAC AAT GGA GCT AAT GCA CCA C AAT TGT CAT GAC AGT TCC ATG	Sequenzierung von CYP719A5
12C10-for1	GAA TGT TTC ACC TCC AAT GAC	Sequenzierung von CYP82B1
26H09-for1 26H09-for2 26H09-rev1	ACG ATA CCC TCT TCT CCA AC TGA GTG CCA TGA AAC GAA ACG C CGT ATC CAT GGA TGA GAC GAG	Sequenzierung von CYP82N1
08B11-for1 08B11-for2 08B11-rev1	TTC TCT AAC CGT CCT TCC AC CAA GAA GGT GGA TGC AAT CCT C CAT GAA TTG TAG TGC AAA CGA CAC	Sequenzierung von CYP82N2
23D07-for1 23D07-for2 23D07-rev1 23D07-rev2	CTC GTC CAT ACC GAG TAG C GTG GTG GTC CAA TTT CAA TGG AC ACT TCT TTA GAG AAG AGG CGA GG CTT AAC TAC AGC TTG GAG GTA TAC C	Sequenzierung von CYP82P1
04B08-for1 08G07-for1	GTT GTG GTT TTC TCT ACG TTT G ATC GAG GAA TCC GAC AG	Sequenzierung der CPR Sequenzierung von EcaERF1

Anhang

18F08-for2	CAT TAA AGA TCT CTC TTC CTT CAG	Sequenzierung von EcaERF2
13G11-for2	GAG ATC CAC ATA AAG CAG CTA G	Sequenzierung von EcaERF3
13G11-5'-RACE 13G11-GSP1 13G11-NGSP1 SMART IIA Oligo	CTA AAT CTC AAA CGG TTG ATG GAT GGA AAT GCC GGA AAG TTT GAC C TCT TCT GTC CAC TAC CAC TAC CAC CCC AAG AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG	5'-RACE von EcaERF3
GSP1 ecabbel GSP2 ecabbel	ATC GGT TGA AAT CCG AGT CCG AAT CC CAG TAT GAT TAC GAA CCC CAT TAA AGG TC	Klonierung des BBE-Promotors
bbe1 -1993 for bbe1 -1453 for bbe1 -438 for bbe1 -161 for bbe1 +91 rev bbe1 -215 rev	CTA TAG GGC ACG CGT GG ATA TGT ATT AGG CGT GGT CG TAG TCA ATC TAA CCA GGC TG GGA CAG TAT CTT ACA CGT GTG AAC AAG AAA GGA GAT CAT TAC C GAG ACC GGT CAA ATC CCG AA	Sequenzierung des BBE-Promotors
GSP1 eca4'omt GSP2 eca4'omt	CTG CAA TTC CTA ACT CAA CTG CAG AAC G CGA AGG ACT AAT GAA TCA GCA AAT CCA	Klonierung des 4'-OMT- Promotors
4'-omt-pro-rev1	CCA CAC AAC ATA CGA GC	Sequenzierung des 4'-OMT- Promotors
GSP1 eca6omt GSP2 eca6omt	TTT GAA GCT AAC TCG GAT AGA GTC ATG G GGT TGC TTG ATC AAT CTT GTC TGC TCC	Klonierung des 6-OMT- Promotors
6-omt-pro-for1a 6-omt-pro-for1b 6-omt-pro-for2	GAC GAA GTC ACT CTA AAA CC CGA ACT GTT AGA CAC AAT TGG CAA TAA GTG AAA ATC GCT TC	Sequenzierung des 6-OMT- Promotors
GSP1 ecacyp80b1 GSP2 ecacyp80b1	GAG CGT GTG GTT TCT CAC CAA GTT GG TAT TGG CCA TGG TTT TGG TCC TGG TG	Klonierung der CYP80B1v1/v2 Promotoren
cyp80b1pro-for1a cyp80b1pro-for1b cyp80b1pro-for1 cyp80b1pro-for2 cyp80b1pro-rev1 cyp80b1pro-rev1b	CGA ATA TCC TGG CTA GAT C CTG CAT GGG TAT TCT GAG CTT GAA ATC GAA TAT CCT GG ATA CAT CAC ATT TAA TTC ACA AGA G TAA GTG CTA CTG TGA CAA CC TAG GGC ACG TGG GAT TAT CC	Sequenzierung der CYP80B1v1/v2 Promotoren
pET41-18F08 ERFdom-for pET41-18F08 ERFdom-rev	GAC GAC GAC AAG ATA CAA ACT CCG ATA GAT ACC GAG GAG AAG CCC GGT TCA TTC GTC TCT CTT AAT CT	Klonierung der ERF-Domäne von EcaERF2 in den Expressionsvektor pET41
S-Tag 18mer	GAA CGC CAG CAC ATG GAC	Sequenzierung von pET41
GCC-Box-for GCC-Box-rev	GAA TTC GAC AGA CAG CCG CCA ATC TGG GAA TTC CCA GAT TGG CGG CTG TCT GTC	Probe für EMSA
mutGCC-Box-for mutGCC-Box-rev	GAA TTC GAC AGA CAT CCT CCA ATC TGG GAA TTC CCA GAT TGG AGG ATG TCT GTC	Probe für EMSA
JERE-for JERE-rev	GAA TTC CAC TCT TAG ACC GCC TTC TTT G GAA TTC CAA AGA AGG CGG TCT AAG AGT G	Probe für EMSA
DRE-for DRE-rev	GAA TTC ATA TCA TAC CGA CAT CAG TT GAA TTC AAC TGA TGT CGG TAT GAT AT	Probe für EMSA
Box S-for Box S-rev	GAA TTC AAA GTA CAG CCA CCA AAG AGG ACC GAA TTC GGT CCT CTT TGG TGG CTG TAC TTT	Probe für EMSA
W1-Box-for W1-Box-rev	GAA TTC ACT TAA TTT GAC CGA GTA AC GAA TTC GTT ACT CGG TCA AAT TAA GT	Probe für EMSA

Danksagung

Prof. Dr. Toni M. Kutchan danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie. Besonders hervorzuheben ist ihre Förderung für ein selbstständiges und eigenverantwortliches Arbeiten.

Für die Übernahme der weiteren Gutachten möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Dr. Jörg Ziegler möchte ich ganz herzlich für seine Hilfe und vielen Ratschläge in praktischen Fragen und die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen danken. Danken möchte ich Jörg auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Dr. Thomas Vogt möchte ich mich ebenfalls für das Korrekturlesen bedanken.

Nadja Grobe danke ich für die angenehme gemeinsame Zeit während ihrer Diplomarbeit, die ich betreuen durfte. Ich wünsche ihr alles Gute und viel Erfolg für ihre Doktorarbeit.

Dr. Christian Ammer danke ich für die Entwicklung des Origin-Skripts zur Auswertung der cDNA-Macroarrays.

Dr. Jim Leebens-Mack (University of Georgia, Athens, USA) möchte ich für die Bereitstellung der *E. californica* cDNA-Klone des FGP danken.

Dem Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie und deren Mitarbeiter/innen der Verwaltung, Technik und Bibliothek danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Claus Wasternack danke ich für seine Unterstützung während des Zusammenschreibens und für die ersten knapp zwei Jahre am IPB.

Besonders möchte ich mich auch bei allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Naturstoff-Biotechnologie für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein großer Dank für die schöne gemeinsame Zeit gebührt den Arbeitskollegen des „großen Labors“ Alfonso Lara Q., Maria Luísa Díaz-Chavez, Khaled Sabarna, der *Papaver*-Transformations-Arbeitsgruppe Dr. Susanne Frick, Stefanie Haase, Katja Kempe sowie Andreas Gesell, Dr. Jon Page, Dr. Robert Kramell, Birgit Ortel und Silvia Wegener.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Eltern für die Ermutigung und Unterstützung während der letzten Jahre.

Mein ganz besonderer Dank für ihr Verständnis und ihre Geduld gilt meiner Lebensgefährtin Barbara Hauser.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), 31.03.2009

Tobias Kurz

Lebenslauf

persönliche Angaben

Name: Tobias Kurz
Anschrift: Viktor-Scheffel-Str. 11, 06114 Halle (Saale)
Geburtsdatum/-ort: 18.05.1973 in Braunschweig
Familienstand: unverheiratet, ein Kind, Nicolas (geb. 01.06.2003)

Ausbildung

Schulausbildung

1979 - 1983 Grundschule Braunschweig
1983 - 1985 Orientierungsstufe Braunschweig
1985 - 1992 Gymnasium „Ricarda-Huch“ Braunschweig,
Abschluss Hochschulreife

Studium

1993 - 2000 Studium der Biologie, TU Braunschweig
Diplomarbeit: Charakterisierung der Pappel (*Populus tremula* × *P. alba*) hinsichtlich ihrer Nitratreduktase-Aktivität, Untersuchungen zur Nitratreduktase-, Aldehydoxidase- und Xanthindehydrogenase-Aktivität von *cnx1* antisense-Pflanzen sowie Sequenzierung eines cDNA-Fragmentes der Nitratreduktase von *Populus trichocarpa*.
1997 - 1998 Auslandsstudium an der Universität Lund, Schweden
Examensarbeit: Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) using particle bombardment.

Tätigkeiten

07/1992 - 09/1993 Zivildienst
Stiftung St. Thomaehof, Braunschweig
05/1998 - 07/1998 Technische Universität Braunschweig
05/1999 - 07/1999 Institut für Botanik, wissenschaftliche Hilfskraft
08/1999 - 11/1999
06/2000 - 03/2002 Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie,
Abteilung Naturstoff-Biotechnologie,
wissenschaftlicher Angestellter (Doktorand)
04/2002 - 04/2006 Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie,
Abteilung Naturstoff-Biotechnologie,
wissenschaftlicher Angestellter (Doktorand)
06/2007 - 12/2008 Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biologie, Abteilung Genetik
wissenschaftliche Hilfskraft
seit 01/2009 Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biologie, Abteilung Genetik
wissenschaftlicher Angestellter

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge:

Diplomarbeit:

Kurz, T. (2000). „Charakterisierung der Pappel (*Populus tremula* × *P. alba*) hinsichtlich ihrer Nitratreduktase-Aktivität, Untersuchungen zur Nitratreduktase-, Aldehydoxidase- und Xanthindehydrogenase-Aktivität von *cnx1* antisense-Pflanzen sowie Sequenzierung eines cDNA-Fragmentes der Nitratreduktase von *Populus trichocarpa*.“ Diplomarbeit im Studienfach Biologie, Technische Universität Braunschweig, Botanisches Institut, Abt. Molekular- und Zellbiologie der Pflanzen

Examensarbeit:

Kurz, T. (1998): „Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) using particle bombardment.“ Section of Plant Cell Biology, Universität Lund, Schweden

Zeitschriftenartikel:

Hänsch R., Kurz T., Schulze J., Mendel R.R., Cerff R. & Hehl R. (2003): Anaerobic induction of the maize GapC4 promoter in poplar leaves requires light and high CO₂. *Planta* **218**, 79-86.

Stenzel I., Hause B., Miersch O., Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I. und Wasternack C. (2003): Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* **51**, 895-911.

Vorträge und Posterpräsentationen:

Kurz T., Stenzel I., Hause B. & Wasternack C. (2001): Functional analysis of allene oxide cyclase – the crucial enzyme in biosynthesis of jasmonates. Kurzvortrag und Poster, EPS Summerschool, Utrecht, Niederlande.

Kurz T., Stenzel I., Hause B., Weichert H., Miersch O., Maucher H., Feussner I. & Wasternack C. (2002): Regulation der Jasmonatbiosynthese in *Arabidopsis* und die Rolle von vier Allenoxidcyclasen. Vortrag, 15. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.

Kurz T. und Kutchan T.M. (2004): Transcriptional regulators of stress-induced alkaloid biosynthetic genes in *Eschscholzia californica*. Poster 13-30, Tagungsband der Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig.