

Die Chlorogensäure:Glukarsäure-Kaffeoyltransferase aus

Solanum lycopersicum

Dissertation

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

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



von

Jenny Teutschbein

geb. am 08.03.1982 in Markranstädt

Gutachter /in

1. Dr. Carsten Milkowski, Martin-Luther-Universität Halle
2. Dr. Bettina Hause, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle
3. Prof. Dr. Dietrich Ober, Christian-Albrechts-Universität Kiel

Verteidigt in Halle (Saale) am 31.08.2011

*Es gibt nur ein einziges Gut für den Menschen:
die Wissenschaft, und nur ein einziges Übel: die
Unwissenheit.*

SOKRATES (469-399 v. Chr)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel	1
1.2 Der generelle Phenylpropanstoffwechsel der Pflanzen	2
1.3 Hydroxyzimtsäuren: Synthese und Funktion	5
1.4 Acyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels	9
1.5 Substratspezifität und Reaktionsmechanismus der SICGT	12
1.6 Zielstellung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Pflanzen	16
2.1.2 Mikroorganismen	16
2.1.3 Plasmide	17
2.1.4 Oligonukleotide	18
2.1.5 Chemikalien und Enzyme	18
2.1.6 Antikörper	18
2.1.7 Geräte	18
2.2 Kultivierung, Transformation und Selektion von Mikroorganismen	19
2.2.1 <i>E. coli</i>	19
2.2.2 <i>S. cerevisiae</i>	20
2.2.3 <i>A. tumefaciens</i>	20
2.3 Kultivierung, Transformation und Selektion von Pflanzen	20
2.3.1 <i>S. lycopersicum</i>	20
2.3.2 <i>N. benthamiana</i>	22
2.4 Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren	22

2.4.1	Isolierung von RNA	22
2.4.2	Isolierung von genomischer DNA.....	23
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	24
2.4.4	Trennung von DNA und RNA über Agarosegele	25
2.4.5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	25
2.4.6	Reinigung von DNA.....	25
2.5	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	26
2.5.1	Restriktionsanalyse.....	26
2.5.2	Ligation	26
2.5.3	Dephosphorylierung	26
2.5.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.5.5	Semiquantitative RT-PCR	28
2.5.6	Realtime-RT-PCR	28
2.5.7	Digoxigenin-Markierung von DNA	30
2.5.8	Sequenzierung und Analyse der DNA	30
2.6	Immobilisierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren.....	31
2.6.1	Immobilisierung von DNA.....	31
2.6.2	Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde.....	31
2.6.3	Southern-Blot-Analyse genomischer DNA.....	32
2.7	Biochemische Methoden und Analytik	32
2.7.1	Proteinextraktion	32
2.7.2	Aufkonzentrierung von Proteinen	34
2.7.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	34
2.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.7.5	Färbung von Proteinen	35
2.7.6	Western-Blot-Analyse	36
2.7.7	CGT-Aktivitätstest	36
2.7.8	Hemmversuche mit Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF).....	37
2.7.9	Extraktion der Kaffeesäureester	37
2.7.10	Analytische HPLC.....	37
2.7.11	Colorimetrischer Lipase-Aktivitätstest.....	37
2.8	Partielle Proteinreinigung.....	38
2.9	5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	39
2.10	Genome Walking.....	40

2.11 Heterologe Proteinexpression.....	40
2.11.1 Expression in <i>E. coli</i>	40
2.11.2 Expression in <i>S. cerevisiae</i>	41
2.11.3 Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i>	42
2.12 Analyse der Reporterexpression im Tabak-Expressionssystem.....	42
2.13 Cytologische Methoden.....	43
2.13.1 Fixierung und Einbettung in Polyethylenglycol (PEG).....	43
2.13.2 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin.....	44
2.13.3 Immunmarkierung.....	44
2.13.4 Mikroskopische Analyse und Bildbearbeitung.....	45
2.14 Statistische Auswertungen.....	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1 Klonierung der <i>SICGT</i>	46
3.1.1 Reinigung der <i>SICGT</i>	46
3.1.2 Isolation der cDNA.....	47
3.1.3 Heterologe Expression von <i>SICGT</i>	49
3.1.4 Genomische Struktur von <i>SICGT</i>	53
3.2 Charakterisierung der <i>SICGT</i>	55
3.2.1 Die Proteinstruktur der <i>SICGT</i>	55
3.2.2 Das katalytische Zentrum der <i>SICGT</i>	57
3.2.3 Hydrolytische Aktivität der <i>SICGT</i>	59
3.3 Biologische Bedeutung der <i>SICGT</i>	60
3.3.1 Regulation der Expression.....	60
3.3.2 Auswirkungen der <i>SICGT</i> -Suppression.....	69
3.3.3 Auswirkungen der <i>SICGT</i> -Überexpression.....	72
3.4 Immunlokalisation der <i>SICGT</i>	75
4. Diskussion.....	77
4.1 Die <i>SICGT</i> -cDNA codiert für eine katalytisch aktive Chlorogensäure: Glukarsäure-Kaffeoyltransferase.....	77
4.2 Die <i>SICGT</i> als GDSL-Lipase-ähnliches Enzym.....	81
4.3 Gezielte Veränderung der <i>SICGT</i> -Expression und ihr Einfluss auf den Stoffwechsel.....	86

4.3.1 Überexpression der <i>SICGT</i>	86
4.3.2 Suppression der <i>SICGT</i> durch RNA-Interferenz	87
4.4 Immunlokalisierung der <i>SICGT</i>	89
4.5 Weiterführende Arbeiten	92
5. Zusammenfassung	94
6. Literaturverzeichnis	96
A. Anhang	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Stellung des Sekundärstoffwechsel im Gesamtstoffwechsel der Pflanze	2
Abbildung 1.2: Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel	4
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der SICGT-Enzymreaktion	11
Abbildung 3.1: SDS-PAGE der SICGT-Reinigungsschritte	47
Abbildung 3.2 Nukleotidsequenz des 5'Race-Fragmentes	48
Abbildung 3.3: Heterologe Expression von <i>SICGT</i> in <i>E.coli</i>	50
Abbildung 3.4: Heterologe Expression von <i>SICGT</i> im <i>S. cerevisiae</i>	51
Abbildung 3.5: Überexpressionskonstrukte für die heterologe Expression der <i>SICGT</i>	52
Abbildung 3.6: Heterologe Expression von <i>SICGT</i> in <i>N. benthamiana</i>	52
Abbildung 3.7: Exon-Intron-Struktur von <i>SICGT</i> aus <i>S. lycopersicum</i>	53
Abbildung 3.8: Genomische Southern-Analyse in <i>S. lycopersicum</i>	54
Abbildung 3.9: Sequenz des abgeleiteten <i>SICGT</i> -Proteins	55
Abbildung 3.10: Sequenzvergleich der <i>SICGT</i> -Proteinsmit anderen GDSL-Lipasen	56
Abbildung 3.11: Hemmversuche der CGT-Aktivität mit PMSF	57
Abbildung 3.12: Mutagenese-Studien der <i>SICGT</i>	58
Abbildung 3.13: Colorimetrischer Assay zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivität	60
Abbildung 3.14: Putative <i>SICGT</i> -Promotorsequenz	62
Abbildung 3.15: Relative Transkriptmenge der <i>SICGT</i> in Kotyledonen	64
Abbildung 3.16: RT-PCR-Analyse des <i>SICGT</i> -Transkripts im Primärblatt.	64
Abbildung 3.17: CGT-Aktivität in Rohextrakten aus Kotyledonen und Primärblättern	65
Abbildung 3.18: Gehalte an löslichen HCA-Metaboliten in <i>S. lycopersicum</i>	66
Abbildung 3.19: RT-PCR-Analyse des <i>SICGT</i> -Transkripts im Gewebe	67
Abbildung 3.20: CGT-Aktivität in verschiedenen Organen von <i>S. lycopersicum</i>	68
Abbildung 3.21: Analysen der löslichen HCA-Metaboliten im Gewebe	69
Abbildung 3.22: RNAi-Konstrukt für die Supression der <i>SICGT</i>	70
Abbildung 3.23: Suppression der <i>SICGT</i> in <i>S. lycopersicum</i> in der T1-Generation	71
Abbildung 3.24: Analyse der <i>SICGT</i> -Suppression in der T2-Generation	72
Abbildung 3.25: Überexpression der CGT in <i>S. lycopersicum</i>	73
Abbildung 3.26: Analyse der <i>SICGT</i> -Überexpression in der T2-Generation	74

Abbildung 4.1: Phylogenetische Analyse CGT-verwandter Proteine	84
Abbildung 4.2: Alignment der vier konservierten Sequenzblöcke der GDSL-Lipasen	85
Abbildung A.1: Sequenzvergleich zwischen genomischer und cDNA-Sequenz	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Substratspezifität der SICGT	12
Tabelle 2.1: Stämme	16
Tabelle 2.2: Vektoren	17
Tabelle 2.3: Generelles Schema einer PCR	27
Tabelle 2.4: Programm zur Durchführung der PCR für ortsgerichtete Mutagenesen	28
Tabelle 2.5: Reaktionsbedingungen der durchgeführten Realtime RT-PCR	29
Tabelle 2.6: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele	35
Tabelle 2.7: Einbettung von <i>N. benthamiana</i> - Blättern in PEG	43
Tabelle 3.1: Reinigungsschema der SICGT aus <i>S. lycopersicum</i>	46
Tabelle 3.2: Sequenzen der ermittelten CGT-Peptide	47
Tabelle A.1: Genutzte Oligonukleotide und deren Verwendungszweck	111
Tabelle A.2: Detaillierte Auflistung putativer cis-regulatorischer Elemente	114
Tabelle A.3: Für die Phylogenieanalyse verwendeten Proteine	116

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
As	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bn	<i>Brassica napus</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CGT	Chlorogensäure:Glukarsäure Kaffeoyltransferase
kDa	Kilodalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid
Kat	Katal (Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
kb	Kilobasenpaare
LB	<i>lysogeny broth</i> (komplexes Nährmedium)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NaPi	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sl	<i>Solanum lycopersicum</i>
SSC	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T_m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBST	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % (v/v) Tween-20
U Unit	(Einheit der Enzymaktivität)
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumeneinheiten
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Einheit der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indol- β -d-galactopyranosid

Aminosäuren mit Positionsbezeichnung werden im Drei- bzw. Einbuchstabencode angegeben. Im Text verwendete Anglizismen und lateinische Begriffe sind kursiv kenntlich gemacht.

1. Einleitung

1.1 Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind Pflanzen nicht in der Lage, sich nachteiligen Veränderungen der Umwelt durch Flucht aktiv zu entziehen. Daher haben sie sich im Zuge der Evolution durch Veränderungen ihres Stoffwechsels an die herrschenden Umweltfaktoren angepasst. Ein wichtiger Aspekt war dabei die Entwicklung einer großen Plastizität des Stoffwechsels. Auch fehlen den Pflanzen echte Ausscheidungsorgane, die Entgiftung von Stoffwechselendprodukten muss also auf anderem Wege stattfinden, zum Beispiel durch Umwandlung in unbedenkliche Speicherformen. Eine wichtige Rolle bei der Anpassung an Umweltbedingungen spielen Pflanzenstoffe, die im Sekundärstoffwechsel der Pflanze gebildet werden.

Der Sekundärstoffwechsel wurde im Zuge der Evolution der Pflanze unter dem Selektionsdruck wechselnder Umweltbedingungen für vielfältige Aufgaben optimiert. Mit Hilfe dieser Stoffwechselebene sind Pflanzen in der Lage, eine Vielzahl chemischer Verbindungen zu synthetisieren, die für Wachstum und Entwicklung abkömmlisch sind, der Pflanze aber das Überleben in einer meist feindlichen Umwelt sichern (Hartmann und Ober 2003). Sekundäre Pflanzenstoffe werden meist in spezialisierten Zellen produziert und übernehmen wichtige ökologische Funktionen (siehe Abbildung 1.1).

Im Gegensatz zu den Produkten des pflanzlichen Primärstoffwechsels, welche das Überleben einer Zelle sichern und daher für den pflanzlichen Organismus unabkömmlisch sind, wurden Sekundärstoffe bis in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts hinein als Abbau- und Abfallstoffe des pflanzlichen Stoffwechsels betrachtet (Hartmann 1996). Erst nach und nach wurde die ökologische Bedeutung der sekundären Pflanzenstoffe bekannt.

Bisher sind mehr als 200.000 verschiedene pflanzliche Sekundärmetabolite bekannt, die durch Modifikation der Phenylpropanoid-, Terpenoid-, Alkaloid- oder Polyketid-Grundgerüste mit Hilfe von Enzymen des Sekundärstoffwechsels entstehen, welche in nahezu allen taxonomischen Gruppen des Pflanzenreiches vorkommen (Croteau et al. 2000).

Die Vielfalt pflanzlicher Sekundärinhaltsstoffe erklärt sich durch die Bildung in zwei Stufen. Zunächst werden die Produkte des Primärstoffwechsels oxidiert, zyklisiert oder

ligiert, dann erfolgt eine weitere Modifikation der Produkte durch Prenylierung, Glycosylierung, Acylierung oder Methylierung (Vogt 2010).

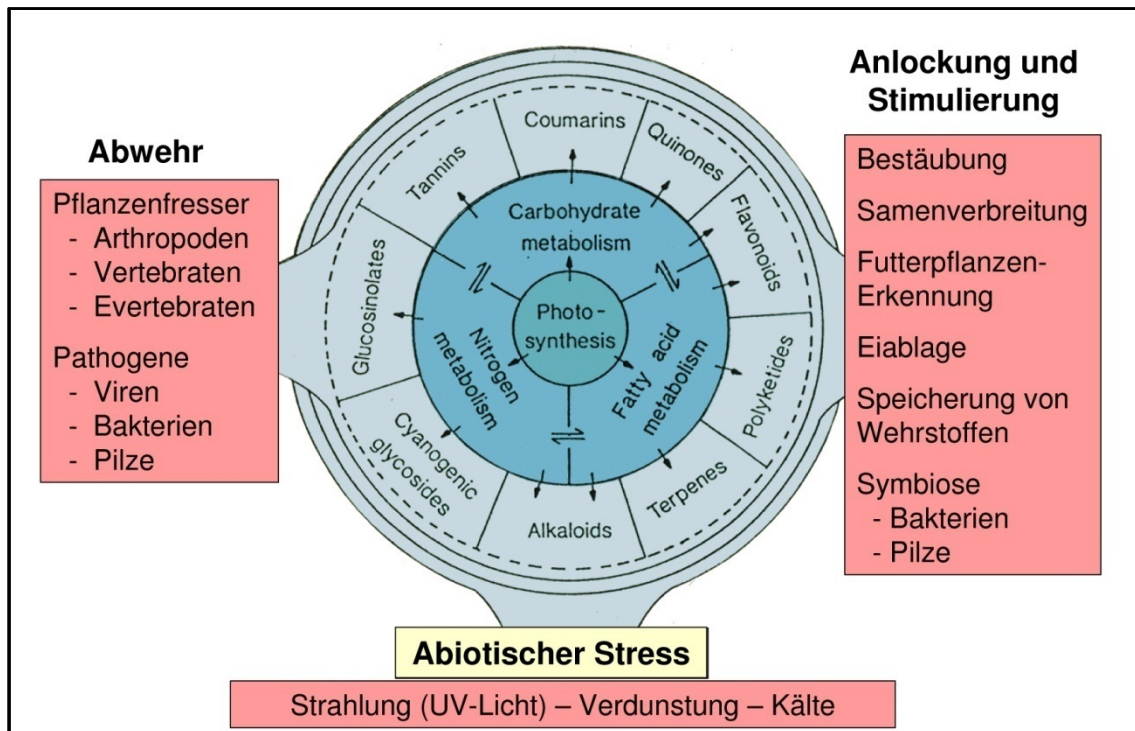


Abbildung 1.1: Stellung des Sekundärstoffwechsels im Gesamtstoffwechsel der Pflanze. Die beiden inneren Kreise symbolisieren den Primärstoffwechsel, aus dem sich die diversen Substanzklassen des Sekundärstoffwechsels ableiten (äußerer Kreis), die in ihrer Gesamtheit die chemischen Wechselwirkungen der Pflanze mit ihrer Umwelt repräsentieren (modifiziert nach (Hartmann 2007)).

1.2 Der generelle Phenylpropanstoffwechsel der Pflanzen

Als Phenylpropane werden Kohlenstoffverbindungen bezeichnet, die aus einem Benzolring und einer Kette aus drei Kohlenstoffatomen aufgebaut sind (C6-C3-Grundgerüst) und obligatorisch eine Hydroxygruppe am aromatischen Ring tragen. Weitere Modifikationen durch z. B. *O*-Methylierungen sind möglich.

Phenylpropane sind im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet und üben viele ökologische Funktionen aus. Durch intensive Forschung in der letzten Dekade konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur zur Biosynthese von Lignin und Flavonoiden genutzt werden, sondern zu vielen Aspekten pflanzlicher Reaktionen auf biotische und abiotische Umweltveränderungen beitragen. So sind sie nicht nur Indikatoren der pflanzlichen Stressantworten auf veränderte Licht- und Mineralstoffverhältnisse, sondern spielen auch

eine Schlüsselrolle in der Pathogenabwehr (La Camera et al. 2004). Des Weiteren begünstigen sie die Besiedlung neuer Habitats (Bais et al. 2003) und stellen Ressourcen für die erfolgreiche Reproduktion der Pflanze zur Verfügung (Dudareva und Pichersky 2008). Aus Phenylpropanen abgeleitete Polymere wie Lignin, Suberin und kondensierte Tannine tragen außerdem zur Stabilität und Widerstandsfähigkeit von Gymnospermen und Angiospermen gegenüber mechanischer oder umweltbedingter Beschädigung (z.B. durch Trockenheit oder Verwundung) bei.

Die Diversität der Phenylpropane ist das Ergebnis effizienter Modifikationen und Erweiterungen einiger weniger Kernstrukturen, die aus dem Shikimatweg hervorgehen (Herrmann 1995). Dabei verbinden aromatische Aminosäure-Lyasen den Phenylalanin- und Tyrosinpool mit den Reaktionswegen des Sekundärstoffwechsels. In der letzten Dekade konnten durch knockout-Mutationen und RNAi-vermittelte Suppression zahlreiche Gene und Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels in Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und weiteren Modellpflanzen identifiziert werden (Alonso et al. 2003; Ossowski et al. 2008). Im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen jedoch weiterhin die regulatorischen Prinzipien und die Bedeutung der Naturstoffe für die Pflanze (Wink 1999). Diese Aspekte können nach Kenntnis der Strukturgene nun auf molekularer Ebene bearbeitet werden. Im Folgenden soll ein Überblick über den generellen Phenylpropanstoffwechsel gegeben werden.

Den Ausgangspunkt für den zentralen Phenylpropanstoffwechsel bilden zum einen das Produkt des Shikimat-Weges, Phenylalanin, zum anderen das Schlüsselenzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), welches den Primär- mit dem Sekundärstoffwechsel verknüpft (Koukol und Conn 1961; Hahlbrock und Scheel 1989; Ritter und Schulz 2004). Gene, die für die PAL kodieren, wurden in einigen Pilzen und allen höheren Pflanzen gefunden. Ihre Expression wird räumlich und entwicklungsabhängig kontrolliert (Lillo et al. 2008; Bhuiyan et al. 2009). Gymnospermen besitzen nur ein *PAL*-Gen, während für Angiospermen mehrere Isoenzyme charakteristisch sind (Wink 1999). So konnten für *A. thaliana* vier Gene, in Pappel fünf und in Reis neun *PAL*-Gene identifiziert werden (Hamberger et al. 2007). Am Beispiel von Tomate (*Solanum lycopersicum*) konnte gezeigt werden, dass in Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) für den Eingangsschritt des Phenylpropanstoffwechsels sogar 20 putative *PAL*-Gene existieren, von denen jedoch nur eines in allen Geweben stark exprimiert wird, während die anderen Gene stillgelegt zu sein scheinen (Chang et al. 2008).

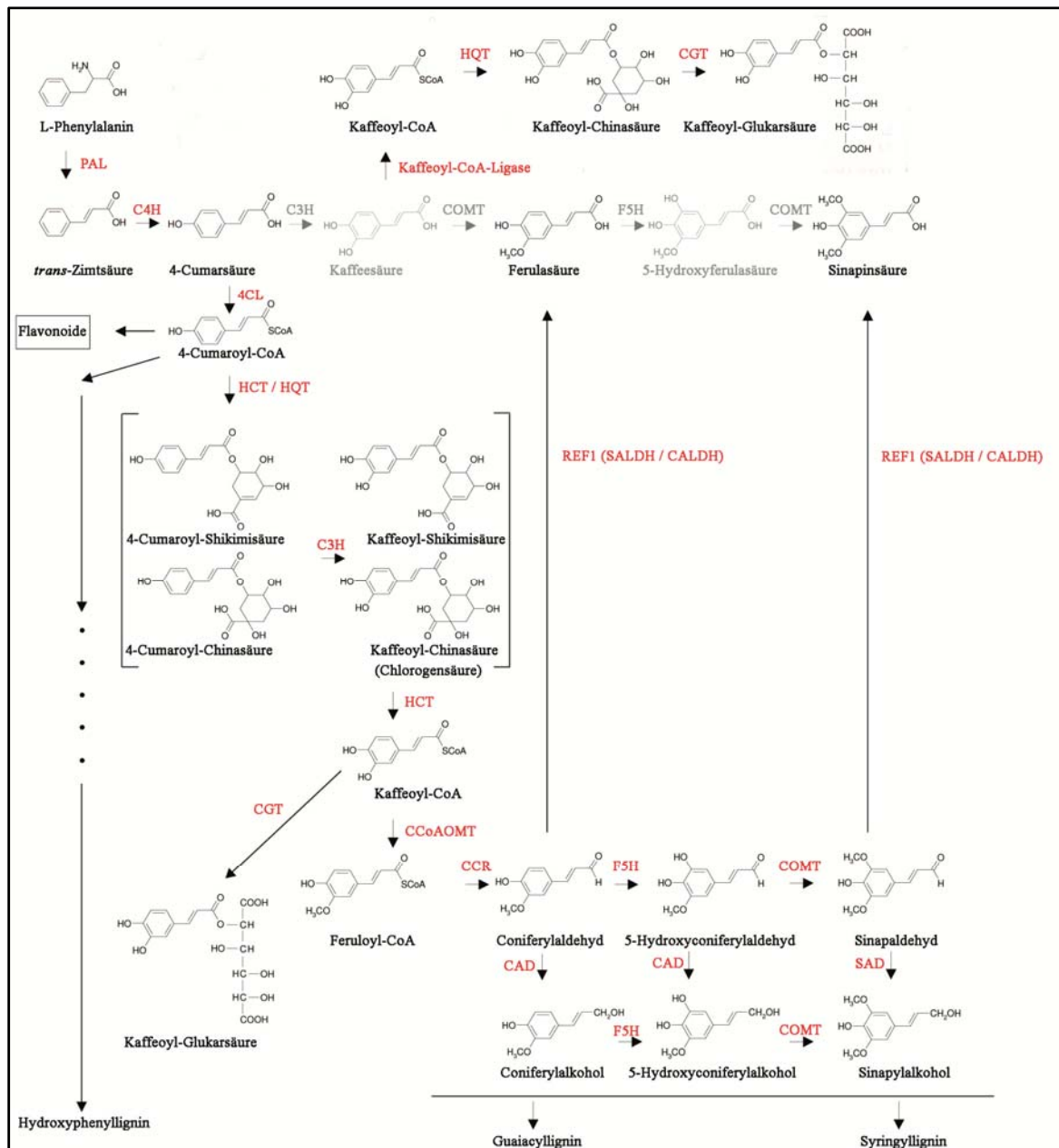


Abbildung 1.2: Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel (modifiziert nach Humphreys und Chapple 2002; Boudet 2007). Grau hinterlegte Strukturen und Enzyme stellen alternative Biosynthesewege dar, die bisher experimentell noch nicht nachgewiesen werden konnten. 4CL, 4-Cumarat-CoA-Ligase; C3H, 4-Cumarsäure-3-Hydroxylase; C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase; CCR, Cinnamoyl-CoA-Reduktase (Gross und Kreiten 1975); CGT, Chlorogensäure:Glukarsäure-Kaffeoyltransferase; CQT, Kaffeoyl-CoA:Chinasäure-Kaffeoyltransferase; CCoAOMT, Kaffeoyl-CoA-O-Methyltransferase (Pakusch et al. 1989); COMT, Kaffeosäure/5-Hydroxyferulasäure-O-Methyltransferase (Shimada et al. 1973); F5H, Ferulasäure-5-Hydroxylase (Grand 1984); HCT, Hydroxycinnamoyltransferase; PAL, Phenylalanin-Ammoniaklyase; SALDH/CALDH, Sinapylaldehyd-Dehydrogenase/Coniferylaldehyd-Dehydrogenase (Nair et al. 2004); SGT, UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (Strack 1980)

Der generelle Phenylpropanstoffwechsel besteht aus drei obligatorischen Schritten. Dabei katalysiert die PAL die nicht-oxydative Desaminierung von Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure (3-Phenylpropensäure). Durch das Enzym Cinnamat-4-Hydroxylase (C4H) wird

die Einführung einer Hydroxylgruppe an Position 4 der *trans*-Zimtsäure katalysiert, wobei 4-Cumarsäure gebildet wird. Die C4H ist ein Membran-gebundenes Cytochrom P450-abhängiges Enzym (Wink 1999), dessen Aktivität das erste Mal in mikrosomalen Präparationen aus Erbsen-Keimlingen (*Pisum sativum*) entdeckt wurde (Russell und Conn 1967; Russell 1971). 4-Cumarsäure kann auch direkt durch Desaminierung der Aminosäure Tyrosin gebildet werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Tyrosin-Ammonium-Lyase (TAL) katalysiert und wird hauptsächlich in Poaceae realisiert (Richter 1998). Auch PAL-Enzyme mit geringer Substratspezifität können diese Reaktion katalysieren, wie z.B. für Mais (*Zea mays*) gezeigt wurde (Rosler et al. 1997).

4-Cumarsäure wird anschließend durch das Enzym 4-Cumarat-CoA-Ligase (4CL) aktiviert, wobei 4-Cumaroyl-CoA entsteht (Lindl et al. 1973). Die 4CL weist ein breites Substratspektrum auf und kann auch andere Hydroxyzimtsäuren zu den entsprechenden CoA-Thioestern umsetzen. In *A. thaliana* sind bisher vier Isoenzyme der 4CL bekannt, die alle etwas unterschiedliche Substratpräferenzen zeigen (Hamberger und Hahlbrock 2004). Während alle höheren Pflanzen in der Lage sind, den generellen Phenylpropanstoffwechsel durchzuführen, werden die von 4-Cumaroyl-CoA abzweigenden Wege art- und gewebespezifisch sehr unterschiedlich genutzt. Dabei dient 4-Cumaroyl-CoA als Substrat für alle weiteren spezifischen Reaktionen (siehe Abbildung 1.2). Unter anderem wird es als direkte Vorstufe für Flavonoide oder zur Ligninbiosynthese genutzt. Lignin ist neben Cellulose das am weitesten verbreitete Polymer weltweit und macht 20-30 % der Gewebe von Gefäßpflanzen aus (Buchanan et al. 2000). Es setzt sich in artenspezifischen Mengen aus Guaiacyl-, Hydroxyphenyl- und Syringyl-Einheiten zusammen und wird durch oxidative Polymerisation von Hydroxyzimtalkoholen gebildet.

1.3 Hydroxyzimtsäuren: Synthese und Funktion

Durch oxidative Einführung von Hydroxylgruppen entstehen aus *trans*-Zimtsäure Hydroxyzimtsäuren (HCA), wie zum Beispiel *p*-Cumarsäure. HCAs und ihre Ester gehören im Pflanzenreich zu den am weitesten verbreiteten Sekundärmetaboliten (Heimann et al. 1971).

HCAs tragen zur Stabilität pflanzlicher Zellwände bei und kommen daher häufig in Abschlussgeweben der Pflanzen, wie zum Beispiel in der Fruchtwand, vor (Watzl und

Rechkemmer 2001). Außerdem sind sie Inhaltsstoffe vieler Gemüsesorten (Tomate, Spinat, Kopfsalat) und damit regelmäßiger Bestandteil unserer Nahrung. Allerdings sind freie HCAs im Allgemeinen nicht in Pflanzen zu detektieren. Sie liegen meist als Ester oder Amide in Verbindung mit anderen Metaboliten vor.

Neuere Untersuchungen zeigten, dass entgegen früheren Annahmen statt einer weiteren Hydroxylierung an Position 3 des aromatischen Ringes der 4-Cumarsäure, bevorzugt die Konjugate der Chinasäure- und Shikimisäure durch das Cytochrom-P450-abhängige Enzym 4-Cumarat-3-Hydroxylase (C3H) zu den jeweiligen Kaffeesäureestern umgesetzt werden (Schoch et al. 2001; Franke et al. 2002a; Franke et al. 2002b). Die Substrate für die C3H werden durch eine Acyltransferase, die Hydroxycinnamoyltransferase (HCT), bereitgestellt, welche 4-Cumaroyl-CoA als Acyldonor und Shikimisäure oder Chinasäure als Acylakzeptor nutzt (Hoffmann et al. 2003). Ausgehend von Kaffeoyl-CoA erfolgt die Synthese von Ferulasäure und Sinapinsäure über weitere Substitutionen am aromatischen Ring, die Reduktion zu den Aldehyden und deren Oxidation zu den entsprechenden Säuren. Für Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass HCAs durch Glucosyltransferasen mit Glucose verestert werden (Strack 1980; Nurmamann und Strack 1981; Milkowski et al. 2000). Des Weiteren wurde für Sinapinsäure gezeigt, dass der entstehende β -Acetalester 1-O-Sinapoylglucose ein hohes Gruppenübertragungspotential für den Sinapoylrest aufweist und als Acyldonor für nachfolgende Umesterungsreaktionen fungiert, in deren Resultat verschiedene akkumulierende Sinapatester entstehen, von denen das samenspezifische Sinapoylcholin (Sinapin) und das in den Vakuolen der Blattepidermis akkumulierende Sinapoylmalat die prominentesten Vertreter sind (Milkowski et al. 2004; Baumert et al. 2005).

Die Funktionen von HCA-Glucose-Estern in der Pflanze sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt und derzeit Gegenstand intensiver Forschung. So wird zum Beispiel im Zusammenhang mit Feruylglucose und Cumaroylglucose über einen Einbau der entsprechenden Hydroxyzimtsäuren über die Ester-Zwischenstufe in die Zellwand diskutiert (Strack et al. 1984; Bokern et al. 1991b). Allerdings konnte diese Hypothese bisher nicht experimentell bewiesen werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass HCAs Bestandteile pflanzlicher Zellwände sind (Fry 1982; Hartley und Ford 1989; Wallace und Fry 1994; Ishii 1997; Mathew und Abraham 2004) und durch alkalische Hydrolyse aus diesen isoliert werden können (Tan et al. 2004). Die Integration in die Primär- sowie Sekundärwand erfolgt vor allem über Esterbindungen (Iiyama et al. 1994a), allerdings ist

der Mechanismus des Einbaus von Hydroxyzimtsäuren in die Zellwand noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglich wäre die Umesterung von CoA-Thioestern der HCAs (Yamamoto et al. 1989; Iiyama, Lam et al. 1994a) oder der Einbau über die entsprechenden Glucose-Ester als Acylendonatoren (Bokern et al. 1991b; Iiyama et al. 1994a).

Auch zur Funktion der HCAs in den Zellwänden werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Vorgeschlagen wurden zum Beispiel die Verstärkung der Matrix innerhalb der Zellwand und die Verhinderung der Zellexpansion. Es wird vermutet, dass durch die Verknüpfung von HCAs mit Pectinen und/oder Extensinen die epidermale Zellelongation und Blattexpansion beschränkt wird, um die UV-exponierte Blattfläche möglichst gering zu halten (Fry 1986; Ruhland et al. 2005; Philippe et al. 2007).

Eine weitere Funktion, die für Hydroxyzimtsäuren diskutiert wird, ist der Schutz vor schädigender UV-Strahlung. Pflanzen sind als photosynthetisch aktive Organismen auf Sonnenstrahlung angewiesen. Als Energiequelle für die Photosynthese nutzen sie Licht der Wellenlänge von 400-800 nm. Durch die Abnahme der Ozonschicht gelangt jedoch gegenwärtig immer mehr kurzwellige Strahlung im UV-Bereich (UV-B: 280-315 nm; UV-A: 315-400 nm) auf die Erdoberfläche, was für die Pflanzen zunehmenden UV-Stress bedeutet. UV-Strahlung beeinflusst neben der Schädigung der DNA (Stapleton 1992; Bharti und Khurana 1997) auch physiologische Prozesse. So ist zum Beispiel die Photosynthese durch die Empfindlichkeit des Photosystems II (PSII) besonders gefährdet. Die D1- und D2-Proteine, die das Reaktionszentrum des PSII bilden, sind extrem UV-sensitiv und werden bereits ab einer UV-B-Rate von $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ abgebaut (Booij-James et al. 2000). Dadurch verringern sich Photosyntheserate und CO_2 -Fixierung.

Prinzipiell gibt es für Pflanzen mehrere Möglichkeiten, sich vor schädigender UV-Strahlung zu schützen. Neben morphologischen Anpassungen, wie z. B. Veränderung der Blattstellung oder Entwicklung von Behaarung, sind das auf molekularer Ebene zum einen DNA-Reparatursysteme (Smith und Wang 1989) und zum anderen Absorption durch Pigmente, die als UV-Filter fungieren. So akkumulieren Pflanzen zum Beispiel Flavonoide und Phenylpropane in den Vakuolen der epidermalen und subepidermalen Zellschichten (Hutzler et al. 1998) und schützen aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften das darunterliegende photosynthetisch aktive Gewebe vor schädigender UV-Strahlung (Li et al. 1993; Sheahan 1996; Bharti und Khurana 1997). Auch die Absorptionseigenschaften

von Flavonoiden und HCAs sprechen für eine Funktion als Schutzpigmente gegen UV-Licht (Markham und Mabry 1975; Sheahan 1996).

Anhand von Mutanten, die Defekte in Enzymen des Phenylpropanstoffwechsels aufweisen, konnte der Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Pflanzen näher untersucht werden. Dabei wurde gezeigt, dass Pflanzen, die sowohl in der Flavonoid-Biosynthese gestört sind, als auch geringere Gehalte an HCA-Konjugaten, wie zum Beispiel Konjugate der Sinpainsäure aufweisen, besonders empfindlich reagieren (Chapple et al. 1992; Li, Oulee et al. 1993; Shirley et al. 1995). Eine Regulation zwischen Flavonoid- und Hydroxyzimtsäurestoffwechsel scheint möglich, da ein Defekt im Flavonoidstoffwechsel den Sinapoylmalat-Gehalt beeinflusst (Landry et al. 1995; Bharti und Khurana 1997), und umgekehrt ein Defekt im Hydroxyzimtsäurestoffwechsel Einfluss auf den Flavonidgehalt nimmt (Sheahan 1996).

Durch Veresterung von HCAs mit Chinasäure (Hexahydrotetraoxybenzoesäure) entstehen Hydroxy-Cinnamoylchinasäuren, wie z. B. Chlorogensäure (5-Kaffeoylchinasäure), das vorherrschende HCA-Konjugat in Solanaceae. Allerdings erfordert die Chlorogensäure-Biosynthese zunächst die Aktivierung der Kaffeesäure in Form des CoA-Thioesters durch das Enzym Kaffeoyl:CoA-Ligase. Kaffeoyl-CoA fungiert in der anschließenden Reaktion als Acyldonor für die Kaffeoyl-CoA:Chinasäure-Kaffeoyltransferase (CQT), die den Kaffeoylrest auf Chinasäure überträgt, was zur Bildung von Chlorogensäure führt. Dieser Verlauf der Chlorogensäuresynthese wurde bereits in den 1970ern für Tomate beschrieben (Rhodes und Woollorton, 1976). In den Wurzeln der Süßkartoffel (*Ipomea batatas*) wurde noch eine weitere Möglichkeit entdeckt. Moriguchi und Mitarbeiter (1988) konnten zeigen, dass *trans*-Zimtsäure zunächst zu *trans*-Cinnamoyl-D-Glucose umgesetzt wird, welche dann weiter zu Kaffeoyl-D-Glucose reagiert. Kaffeoylglucose fungiert dann als aktivierter Acyldonor in einer Umesterungsreaktion, in deren Verlauf der Kaffeoylrest auf Chinasäure übertragen wird. In einer rückläufigen Reaktion kann der Kaffeoylrest der Chlorogensäure durch die HCT auch wieder auf Coenzym A übertragen werden. Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle für die Bildung von Kaffeoyl-CoA im Phenylpropanstoffwechsel (Abbildung 1.2, Hoffmann et al. 2003).

Mögliche Funktionen der Chlorogensäure als Abwehrstoff oder potenzielles Antioxidans werden noch diskutiert (Petersen et al. 2009). Um den möglichen Nutzen der Chlorogensäure als funktionelles Antioxidans näher zu untersuchen, wurde durch Überexpression einer HCT in Tomate (Niggeweg et al. 2004) oder eines MYB-

Transkriptionsfaktors in Kartoffelknollen eine Überproduktion dieses Phenylpropan angestrebt (Rommens et al. 2008). Tomatenpflanzen, die die HCT überexprimierten, zeigten nicht nur eine geringere Schädigung des Photosynthese-Apparates nach Behandlung mit dem Oxidans Paraquat, sondern auch eine höhere Resistenz gegenüber Infektionen mit *Pseudomonas syringae* (Niggeweg, Michael et al. 2004). Die Diversität der Hydroxy-Cinnamoylchinasäuren wird wiederum durch die nachfolgende Wirkung einer Reihe von Oxygenasen, Reduktasen und vor allem Transferasen erreicht.

1.4 Acyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels

Acyltransferasen (EC 2.3.1.x) katalysieren die Übertragung einer Acylgruppe von einem Donormolekül auf die Hydroxyl-, Amino- oder Thiolgruppe eines Akzeptormoleküls unter Bildung eines Acylkonjugates, wobei entweder CoA-Thioester oder 1-*O*-Glucoseester (β -Acetalester) als Acyldonoren akzeptiert werden.

Hydroxyzimtsäure-CoA-Thioester wurden erstmals bei Transacylierungsreaktionen in der Biosynthese von Chlorogensäure beschrieben (Stöckigt und Zenk 1974). Seitdem konnten durch intensive Forschungen noch eine Vielzahl weiterer Acyltransferasen identifiziert werden, die CoA-Thioester aktivierte Acyldonoren akzeptieren. So katalysieren diese Enzyme unter anderem die Bildung von *O*-Estern mit Shikimisäure (Ulbrich und Zenk 1980), Chinasäure (Ulbrich et al. 1976; Lamb 1977), diversen Zuckern (Strack et al. 1987), Isocitrat (Strack et al. 1986), aber auch mit Flavonolglucosiden (Saylor und Mansell 1977) oder Anthocyanen (Kamsteeg et al. 1980). Diese Acyltransferasen gehören zur Familie der BAHD-Acyltransferasen, benannt nach den ersten vier identifizierten Enzymen dieser Enzymfamilie, Benzylalkohol-Acetyl-, Anthocyanin-*O*-hydroxycinnamoyl-, Anthranilat-*N*-hydroxycinnamoyl/benzoyl- und Deacetylvindolin- Acetyltransferase (St-Pierre und De Luca 2000).

Die zweite Gruppe von Acyltransferasen nutzt das hohe Gruppenübertragungspotential von 1-*O*-Glucoseestern (Mock und Strack 1993). In der Reaktion von 1-*O*-Acylglucose mit dem Akzeptormolekül entsteht dabei unter Freisetzung von Glucose ein *O*-Ester, wie z. B. bei der Synthese einfacher Gallotannine (verschieden substituierte *O*-Galloylglucosen) in verschiedenen Eichenarten (Schmidt et al. 1987; Niemetz und Gross 2005) und von Fettsäure-Glucoseestern in Trichomen der Wildtomate (Li und Steffens 2000). Bereits

1972 wurde für die Biosynthese von Chlorogensäure aus Kaffeoylglucose und Chinasäure eine Rolle für aktivierte Glucoseester als Acyldonoren im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel beschrieben (Kojima und Uritani 1972). Allerdings wurde das für diese Reaktion verantwortliche Enzym, die Chinasäure-Hydroxycinnamoyltransferase erst später identifiziert (Kojima und Kondo 1985).

In Kreuzblütengewächsen (*Brassicaceae*) wird der aktivierte Sinapinsäure-Glucoseester (1-*O*-Sinapoyl- β -Glucose) in Sinapoyl-L-Malat (Sinapoylmalat) oder Sinapoylcholin überführt (Dahlbender und Strack 1986; Gräwe et al. 1992). In Radieschen (*Raphanus sativus*) und anderen Brassicaceen dient ein zweites Molekül Sinapoylglucose als Acylakzeptor für die Synthese von 1,2-*di-O*-Sinapoylglucose (Dahlbender und Strack 1986; Gräwe et al. 1992). Das Produkt dieser Disproportionierungsreaktion, 1,2-*di-O*-Sinapoyl- β -Glucose, wurde kürzlich auch in Arabidopsis (Fraser et al. 2007) und Raps (Baumert, Milkowski et al. 2005) nachgewiesen.

Anhand der Sinapoyltransferasen aus Arabidopsis und weiteren Brassicaceen und der Isobutyryltransferasen aus Tomate wurde außerdem nachgewiesen, dass zumindest diese 1-*O*-Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen zur Gruppe der SCPL-Proteine (*serine carboxypeptidase like*) gehören (Lehfeldt et al. 2000; Li und Steffens 2000; Steffens 2000; Baumert, Milkowski et al. 2005).

In Wurzeln der Süßkartoffel katalysiert die 1-*O*-Hydroxycinnamoyl- β -Glucose:Chinasäuretransferase die Übertragung des Hydroxymzimtsäurerestes von 1-*O*-Cumaroylglucose und 1-*O*-Kaffeoylglucose auf Chinasäure (Villegas und Kojima 1986). Auch im Hormonstoffwechsel von Mais wurden 1-*O*-Glucoseester-abhängige Acyltransferasen nachgewiesen. Sie katalysieren die Synthese von Indol-3-ylacetat, wobei aktivierte 1-*O*-Indol-3-ylacetylglucose mit *myo*-Inositol verestert wird (Kesy und Bandurski 1990).

Weitere Transacylierungen ausgehend von einem Glucoseester konnten des Weiteren auch für junge Blätter des Hammerstrauches (*Cestrum elegans*) und für Pflanzen der Ordnung *Caryophyllales* gezeigt werden (Bokern und Strack 1988; Strack et al. 1988; Bokern et al. 1991a).

Eine Ausnahme in der Gruppe der Acyltransferasen bilden zwei Enzyme aus Tomate und Süßkartoffel, die weder CoA-Thioester noch 1-*O*-Glucoseester als Acyldonatoren verwenden.

Aus Wurzeln der Süßkartoffel wurde nach Verwundung die Acyltransferase Chlorogensäure:Chlorogensäure-Kaffeoyltransferase isoliert, welche Chlorogensäure sowohl als Acyldonor als auch als Acylakzeptor nutzt, um Isochlorogensäure zu synthetisieren (Kojima und Kondo 1985; Villegas und Kojima 1986; Villegas et al. 1987). In Tomate nutzt das Enzym Chlorogensäure:Glukarsäure-Kaffeoyltransferase (SICGT) ebenfalls die für *Solanaceae* charakteristische Chlorogensäure als Acyldonor für die Synthese von Kaffeoylglukarat bzw. -galaktat (Strack und Gross 1990). In Abbildung 1.3 ist die Enzymreaktion schematisch dargestellt.

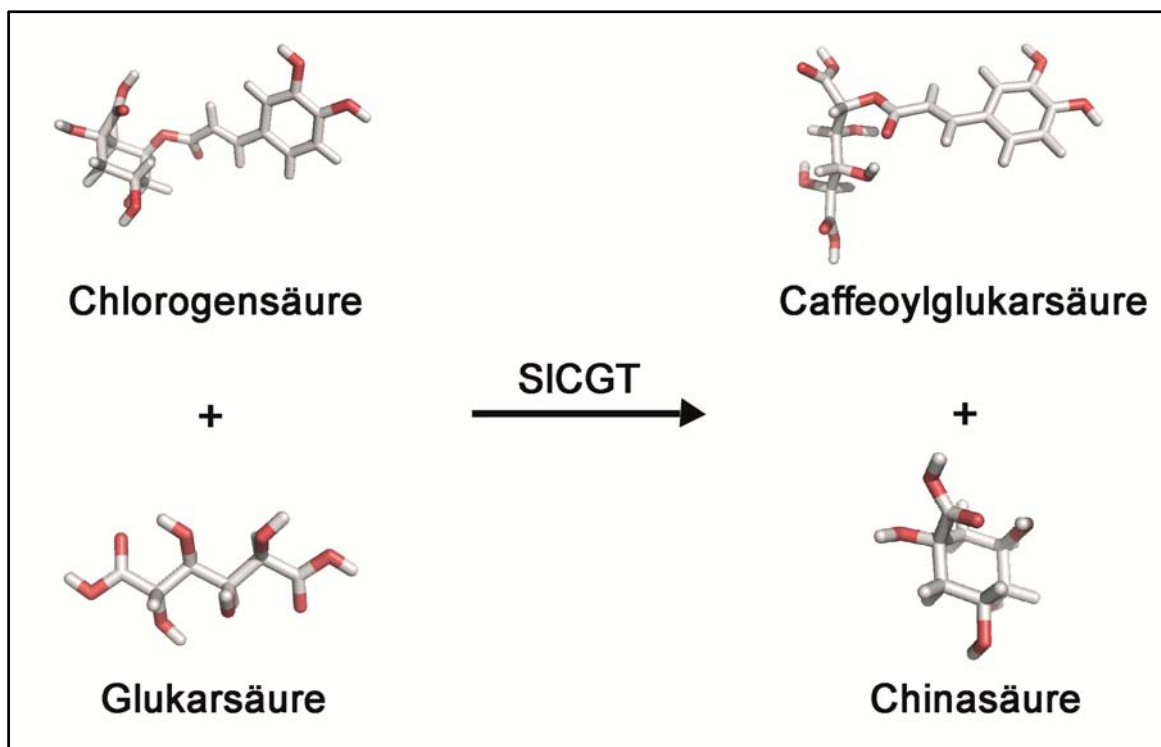


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der durch die Chlorogensäure:Glukarsäure-Kaffeoyltransferase katalysierten Enzymreaktion

Bisher sind diese beiden Enzyme jedoch das einzige Beispiel für Akzeptorspezifität gegenüber Chlorogensäure als Acyldonor in der HCA-*O*-Ester-Biosynthese. Diese Art der Umesterung erfordert anscheinend spezielle Acyltransferasen, deren Identität bisher noch nicht genauer untersucht wurde.

1.5 Substratspezifität und Reaktionsmechanismus der SICGT

Die SICGT wurde sowohl hinsichtlich der Substratspezifität als auch des Reaktionsmechanismus bereits näher untersucht (Strack und Gross 1990). Während der Analysen der Substratpräferenzen wurden als mögliche Acyldonoren drei Kaffeoylchinasäure-Isomere und zwei 4-Coumaroylchinasäure-Isomere und als mögliche Acylakzeptoren neben Glukar- und Galaktarsäure auch Glukonsäure, Glukuronsäure, Galakton- und Galakturonsäure getestet. Das Enzym war innerhalb dieser Analysen streng spezifisch gegenüber Chlorogensäure als Acyldonor und Glukar- bzw. Galaktarsäure als Acylakzeptoren (Tabelle 1.1). Diese Reaktion verläuft irreversibel.

Tabelle 1.1 Substratspezifität der SICGT. ^a V_{\max} mit Glukarsäure = 624 nkat mg^{-1} Protein; V_{\max} mit Galaktarsäure = 310 nkat mg^{-1} Protein; K_m -Werte der Akzeptoren: Glukarsäure = 0,4 mM und Galaktarsäure = 1,7 mM; ^b Kein Produkt nach HPLC-Analyse (modifiziert nach Strack und Gross 1990)

Substrate		V_{\max}/K_m^a
Acyldonor	Acylakzeptor	
Chlorogensäure	+ Glukarsäure	1560
Kryptochlorogensäure	+ Glukarsäure	- ^b
Neochlorogensäure	+ Glukarsäure	- ^b
5-O-(4-Coumaroyl)-Chinasäure	+ Glukarsäure	- ^b
3-O-(4-Coumaroyl)-Chinasäure	+ Glukarsäure	- ^b
Chlorogensäure	+ Galaktarsäure	182
Chlorogensäure	+ Gluconsäure	- ^b
Chlorogensäure	+ Glucuronsäure	- ^b
Chlorogensäure	+ Galaktonsäure	- ^b
Chlorogensäure	+ Galaturonsäure	- ^b

Im Zuge dieser Analysen wurden außerdem die kinetischen Konstanten der SICGT-katalysierten Reaktion ermittelt (Strack und Gross 1990). Dabei wurde eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 624 nkat $(\text{mg Protein})^{-1}$ mit Glukarsäure als Acylakzeptor und 310 nkat $(\text{mg Protein})^{-1}$ für Galaktarsäure als Acylakzeptor ermittelt. Die Auftragung der reziproken Umsatzgeschwindigkeit $1/V$ gegen die reziproke Substratkonzentration $1/[S]$ nach Lineweaver und Burk ergab parallele Graphen, was auf einen Ping-Pong-Mechanismus hindeutet (Schellenberger 1998). Bei einer konstanten Chlorogensäurekonzentration von 20 mM konnte ein K_m -Wert von 0,4 mM für

Glukarsäure und 1,7 mM für Galaktarsäure bestimmt werden. Der K_m -Wert für Chlorogensäure betrug 20 mM bei einer konstanten Zuckersäurekonzentration von 8 mM. Das Verhältnis von V_{max}/K_m für Glukarsäure und Galaktarsäure betrug 100:12. Dieses Ergebnis konnte mit Substrat-Konkurrenz-Experimenten bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass beide Zuckersäuren als konkurrierende Inhibitoren wirken, wenn beide als zweites Substrat in der Enzymreaktion dienen. Die SICGT zeigt außerdem die höchste Affinität gegenüber Glukarsäure als Acylakzeptor (Strack und Gross 1990).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Aus Blättern der Tomate konnte erstmals eine weitere Acyltransferase isoliert werden, die als Acyldonor die für *Solanaceae* charakteristische Chlorogensäure in der Biosynthese von Kaffeoylglukarsäure akzeptiert. Diese Chlorogensäure-abhängige Acyltransferase wurde als Chlorogensäure:Glukarsäure-Kaffeoyltransferase (SICGT) klassifiziert.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Klonierung, Charakterisierung und Lokalisierung der SICGT, um erste Einblicke in die Funktion und Regulation sowie Evolution dieser ungewöhnlichen Acyltransferase zu gewinnen.

Im ersten Teil der Arbeit sollte zunächst die Identität der CGT aufgeklärt werden. Dazu wurde das Enzym über Ionenaustausch- und Molekularsieb-Säulenchromatographie bis hin zur gelelektrophoretischen Homogenität gereinigt und partiell sequenziert. Die Schwerpunkte lagen des Weiteren auf der Identifizierung der *SICGT*-cDNA sowie der Aufklärung der Genstruktur und Kopienzahl des Genes mittels Southern Blot-Analysen. Sequenzanalysen sollten Hinweise auf die Verwandtschaft der CGT zu anderen Enzymen und zur funktionellen Rekrutierung der SICGT aus einer Enzymklasse des Primärstoffwechsels geben.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte dann die molekulare Charakterisierung der Acyltransferase-Aktivität des untersuchten Enzyms. Hierzu gehörten die Ermittlung funktioneller Aminosäuren, die Identifizierung des katalytischen Zentrums, kinetische Analysen der Enzymreaktion und Untersuchungen zu einer eventuell vorhandenen hydrolytischen Restaktivität.

Um näheres über die biologische Bedeutung der CGT zu erfahren, sollten zunächst die *SICGT*-Transkript- und Proteinakkumulation räumlich und zeitlich untersucht werden. Mit diesen Untersuchungen sollte die Rolle der SICGT in der Regulation des Phenylpropanstoffwechsels in der Tomate auf organ- und gewebespezifischer bzw. zellulärer Ebene weiter aufgeklärt werden. Über „genome-walking“-Ansätze sollte außerdem der *SICGT*-Promotor ermittelt werden, um Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation der *SICGT*-Genexpression durchführen zu können. Des Weiteren sollten Analysen der Produktakkumulation sowie eine Modulation der Genexpression (Suppression, Überexpression) mit anschließendem „Metabolite Profiling“ erfolgen. Beim Erhalt stabiler transgener Linien sollten diese genutzt werden, um die

biologische Bedeutung des Enzyms durch umfangreiche Analysen (Pathogenabwehr, UV-Resistenz) näher zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Alle molekularbiologischen, biochemischen und immuncytologischen Untersuchungen der CGT wurden an *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker vorgenommen. Das Saatgut wurde durch Chrestensen, Erfurt geliefert. Für die Untersuchungen der heterologen Expression der *SICGT* in Pflanzen wurde die Tabaksorte *Nicotiana benthamiana* L. verwendet.

2.1.2 Mikroorganismen

Alle für Klonierungsarbeiten und Expression der CGT verwendeten Bakterienstämme der Arten *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Agrobacterium tumefaciens* sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Stämme

Stamm	Hersteller	Verwendung	Genotyp
XL1-Blue (<i>E. coli</i>)	Stratagene (La Jolla, CA, USA)	Allgemeine Klonierungsarbeiten	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proABlacIq ^z ΔM15 Tn10 (Tetr ^r)]
BL21-CodonPlus (D3)-RIL (<i>E. coli</i>)	Stratagene	Heterologe Expression	F ⁻ amp ^r hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r galλ (D3) endA Hte[argU proL leuW Cam ^r]
InvSC1 (<i>S. cerevisiae</i>)	Invitrogen	Heterologe Expression	MATα his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52/MATα his3_1leu2 trp1-289 ura3-52
GV2260 (<i>A. tumefaciens</i>)	(McBride und Summerfelt 1990)	Transformation von Tabak	pTiB6S3_T-DNA in C58C1; Rif ^r , Carb ^r

2.1.3 Plasmide

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die für Klonierungsarbeiten und Transformationen verwendeten Vektoren.

Tabelle 2.2: Vektoren

Bezeichnung	Hersteller	Selektion	Verwendung	Besonderheiten
pGEM®TEasy	Promega	Ampicillin	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	Komplementation auf X-Gal-Medien
pET 28a(+)	Novagen (Darmstadt)	Kanamycin	heterologe rekombinante Proteinexpression (<i>E. coli</i>)	Expression mit IPTG induzierbar Klonierung mit C- bzw. N-terminalem His-tag möglich
pDIONYSOS	pYES- Abkömmling Invitrogen (Stehle et al. 2008)	<i>E. coli</i> : Ampicillin <i>S.cerevisiae</i> : ura-3	heterologe rekombinante Proteinexpression (<i>S. cerevisiae</i>)	induzierbarer GAL1- Promotor; pYES-Vektor mit zusätzlichem <i>leu2d</i> - Marker, <i>high copy</i> Vektor
pImpact1.1, pImpact1.1- tag	Plant Research International	Ampicillin	Subklonierung	lichtregulierter Promotor, Klonierung mit C- bzw. N-terminalem His-tag möglich
pBINPLUS	Plant Research International	Kanamycin	binärer Vektor für die Pflanzentransformation	Integration der Expressionskassette aus pImpact1.1
pB35SNGUS	pBlueScript- Abkömmling Stratagene	Ampicillin	Subklonierung von RNAi -Konstrukten	Subfragment des <i>gusA</i> -Genes als <i>spacer</i> -Element; 35S-Promotor
pLH7000	(Hausmann und Töpfer 1999)	Spectinomycin	binärer Vektor für die Pflanzentransformation	<i>BAR</i> -Gen für die Selektion transgener Pflanzen mit Basta®

2.1.4 Oligonukleotide

Alle benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Ein Verzeichnis aller verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang (Tabelle A.1).

2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (www.carl-roth.de), Sigma (www.sigmaaldrich.com) und Merck (www.merck.de) bezogen. Für molekularbiologische Arbeiten wurden Enzyme von Roche (www.roche.de), New England Biolabs (www.neb.com), Invitrogen (www.invitrogen.com), Promega (www.promega.com), Qiagen (www.qiagen.com) und Stratagene (www.genomics.agilent.com) verwendet. Lösungen und Medien wurden mit doppelt entsalztem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (www.bionity.com) angesetzt.

2.1.6 Antikörper

Für Western Blot-Analysen wurde als primärer Antikörper ein monoklonaler Anti-6x-His-tag-Antikörper aus Maus (Novagen, www.merck-chemicals.de) verwendet. Der Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG war für die enzymatisch-kolorimetrische Detektion mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert. Die FAB-spezifischen Anti-Maus-IgG AP-Konjugate wurden von der Firma Sigma bezogen.

Für die immunocytoologischen Untersuchungen wurde ebenfalls der monoklonale Anti-6x-His-Tag-Antikörper aus Maus verwendet. Als sekundärer Antikörper diente hier ein Fluoreszenz-konjugierter Anti-Maus-IgG-Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Alexa Fluor 488 fluoresziert bei Blauanregung grün (Absorption 495 nm, Emission 541 nm).

2.1.7 Geräte

Zentrifugen: 5417R-Tischzentrifuge (Eppendorf, www.eppendorf.de)
 5810R-Tischzentrifuge (Eppendorf)
 Sorvall Super T21 (DuPont, www.dupont.com)

Thermocycler:	Eppendorf MasterCycler Gradient (Eppendorf)
Thermomixer:	Eppendorf comfort (Eppendorf)
Elektrophoresen:	Mini-PROTEAN II (BioRad, www.bio-rad.com) XCell SureLock R Mini-Cell (Invitrogen)
Spektrophotometer:	Beckman DU 640 (Beckman, www.beckmancoulter.com) Nano Drop ND1000 (Peqlab, www.peqlab.de)
Mikrotom:	HM335E (Microm, www.microm-online.com)
Mikroskope:	AxioImager (Zeiss, www.zeiss.de)
Kugelmühle:	Schwingmühle MM200 (Retsch, www.retsch.de)
HPLC:	Waters TM Millipore System (Waters, www.waters.com)
FPLC:	ÄktaExplorer (GE Healthcare Life Sciences, www.gehealthcare.com)
pH-Meter:	inoLab pH Level 1 (WTW, www.wtw.com)
Spannungsgerät:	Power Supply EPS 301 (GE Healthcare Life Sciences)
Ultraschall:	UW 2070 (Bandelin, www.bandelin.com)
Ultraturrax:	IKA Werke GmbH & Co. KG
Elektroporator:	Micropulser TM (BioRad)

2.2 Kultivierung, Transformation und Selektion von Mikroorganismen

2.2.1 *E. coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder auf Agarplatten oder als Suspensions-schüttelkultur (180-200 rpm) in *lysogeny broth*-Medium [LB, (Bertani 2004)] bei 37°C. Die Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen: 100 µg·ml⁻¹ Carbenillicin, 100 µg·ml⁻¹ Kanamycin, 100 µg·ml⁻¹ Spectinomycin, 12,5 µg·ml⁻¹ Tetracyclin und 25 µg·ml⁻¹ Rifampicillin. Die Transformation mit Plasmiden erfolgte mit Hilfe der Hitzeschock-Methode (Sambrook et al. 1989). Die Herstellung der kompetenten Zellen wurde ebenfalls nach Sambrook et. al. (1989) durchgeführt.

2.2.2 *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte auf YPD [2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glucose, 2 % (w/v) Agar für Platten] und Leucin- bzw. Uracil-Mangelmedium [*drop-out* Medium ohne Leucin bzw. Uracil, 6,7 g l⁻¹ synthetischer Hefeextrakt ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Glucose bei Agarplatten bzw. 4 % (w/v) Raffinose in Flüssigkulturen, 2 % (w/v) Agar für Platten] entweder auf Agarplatten oder als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) bei 30°C. Die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte mit dem EasyComp Kit (Invitrogen) und diese wurden entsprechend der Herstellerangaben transformiert.

2.2.3 *A. tumefaciens*

Die Anzucht von Agrobakterien erfolgte wenn nicht anders beschrieben in LB-Medium bei 28°C. Die Herstellung elektrokompenter Zellen und die Transformation mit Plasmiden wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.3 Kultivierung, Transformation und Selektion von Pflanzen

2.3.1 *S. lycopersicum*

Zur Anzucht der Pflanzen wurden Samen auf Erde ausgelegt und im Gewächshaus unter natürlichen Lichtbedingungen bei 24°C zum Keimen gebracht. Die Keimlinge wurden nach ca. zwei Wochen in einzelne Töpfe pikiert und weiterhin im Gewächshaus angezogen.

Für die Agrobakterium-vermittelte stabile Transformation wurden zunächst die Samen drei Minuten in 70 % Ethanol geschüttelt und anschließend für zehn Minuten in 1,5 % Natriumhypochlorid sterilisiert. Nach dreimaligem Waschen in sterilem Wasser wurden die Samen getrocknet und zwei Tage im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Danach wurden die sterilen Samen in Kulturtöpfchen (Duchefa) auf Keimungsmedium (4,4 g l⁻¹ Murashige & Scoog Medium + Vitamine; 30 g l⁻¹ Saccharose; pH 5,8; 8 g l⁻¹ Plantagar) ausgelegt und im Dunkeln für zwei Wochen bei 22°C angezogen. Die Kotyledonen der Keimlinge wurden dann in flüssigem Konditionierungsmedium (4,4 g l⁻¹ Murashige & Scoog-Medium +

Vitamine; 30 g l⁻¹ Saccharose; pH 5,8; 0,1 mg l⁻¹ 6-Benzylaminopurin, 1 mg l⁻¹ Naphthalinsäure, 8 g l⁻¹ Plantagar für Platten) zurechtgeschnitten, Blattspitze und -basis wurden entfernt und das gesamte Blatt quer über die Mittelrippe eingeritzt. Danach wurden die Blattstückchen mit der Oberseite nach unten auf Agarplatten mit Konditionierungsmedium gelegt und weitere zwei Tage im Dunkeln inkubiert. Der zur Transformation verwendete Agrobakterienstamm GV2260 (McBride und Summerfelt 1990) wurde einige Tage vor der Transformation auf LB-Medium angezogen. Zwei Tage vor der Transformation wurden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie des Stammes angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 28°C inkubiert. Am Tag vor der Transformation wurden 20 ml Transformationsmedium [1 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Bakto-Pepton, 0,5 % (w/v) Natriumchlorid, 0,2 mM Acetosyringon] mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit 200 µl der Vorkultur inokuliert und ebenfalls über Nacht unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 4000 rpm abzentrifugiert und mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt.

Die vorinkubierten Blattstückchen wurden nun für 10 min in der Bakteriensuspension geschwenkt, auf sterilem Filterpapier getrocknet und mit der Oberseite nach unten auf neues Konditionierungsmedium gelegt. Nach weiteren zwei Tagen Inkubation im Dunkeln wurden die Blattstückchen dreimal 15 Minuten in Waschlösung (1,1 g l⁻¹ MS+Vitamine, pH 5,8; 1 g l⁻¹ Cefotaxim) geschwenkt, auf Filterpapier getrocknet und mit der Blattoberseite nach oben auf Selektionsmedium gelegt (4,4 g l⁻¹ Murashige & Scoog-Medium + Vitamine; 30 g l⁻¹ Saccharose; pH 5,8; 1 mg l⁻¹ trans-Zeatin; 250 mg l⁻¹ Ticarcillin; 100 mg ml⁻¹ Kanamycin bzw. 50 mg ml⁻¹ Phosphinotrycin; 8 g l⁻¹ Plantagar). Die Selektion transgener Pflanzen erfolgte je nach transformiertem Plasmid entweder auf Kanamycin oder Phosphinotrycin-Resistenz. Zur weiteren Anzucht wurden die Platten im Lichtraum unter Langtagbedingungen bei 22°C inkubiert. Die Kotyledonen wurden wöchentlich auf frisches Medium umgesetzt, sich entwickelnde Kalli und Sprosse wurden vom Blatt getrennt und direkt mit dem Selektionsmedium in Kontakt gebracht. Nach etwa drei Wochen wurden die Sprosse auf Bewurzelungsmedium (4,4 g l⁻¹ Murashige & Scoog-Medium + Vitamine; 30 g l⁻¹ Saccharose; pH 5,8; 0,1 g ml⁻¹ Indolessigsäure, 20 mg l⁻¹ Kanamycin bzw. Phosphinotrycin, 500 mg l⁻¹ Vancomycin; 8 g l⁻¹ Plantagar) umgesetzt und weiterhin im Lichtraum kultiviert. Nach erfolgreicher Bewurzelung und Überprüfung

auf eine positive Transformation wurden die Pflanzen auf Erde überführt und bis zur Fruchtreife unter natürlichen Lichtbedingungen im Gewächshaus kultiviert.

2.3.2 *N. benthamiana*

N. benthamiana wurde im Gewächshaus in Erde bei 23°C unter Langtagbedingungen kultiviert. Die Agrobakterien-vermittelte Transformation erfolgte durch Infiltration etwa zehn Wochen alter Blätter mit dem Stamm GV2260 (McBride und Summerfelt 1990) nach einem modifizierten Protokoll von Kapila et. al. (1997). Dafür wurden 5 ml YEB-Medium [0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Fleischextrakt, 0,5 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 2 mM MgSO₄; pH 7,0] mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einer Agrobakterium-Glycerolkultur inokuliert und über Nacht bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte die Zugabe von 20 µM Acetosyringon, 10 mM Glucose und 10 mM MES (pH 5,6). Die Bakterien wurden weiterhin unter den angegebenen Bedingungen inkubiert und sollten am dritten Tag eine OD₆₀₀ von ungefähr 3 aufweisen. Die Bakteriendichte wurde nun mit 2x Infiltrationsmedium [10 % (w/v) Saccharose, 20 mM Glucose, 8,6 g l⁻¹ MS; pH 5,6] und Wasser auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Nach Zugabe von 200 µM Acetosyringon erfolgte die Infiltration der Blätter mit Hilfe einer 1 ml-Spritze durch die Spaltöffnungen auf der Blattunterseite. Die Pflanzen wurden einige Stunden dunkel gestellt und anschließend für fünf Tage im Gewächshaus kultiviert. Die infiltrierten Blattbereiche konnten optisch gut von nicht infiltrierten Bereichen unterschieden werden und wurden für weitere Analysen ausgeschnitten.

Für die Co-Infiltration mit einem GUS-Fusionskonstrukt wurden beide Bakterienkulturen getrennt voneinander angezogen, induziert und vor der Infiltration vereinigt. Dabei wurde bei beiden Kulturen eine Bakteriendichte von OD₆₀₀=1 eingestellt.

2.4 Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren

2.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenteilen erfolgte entweder mit dem RNeasy Mini-Kit der Firma Qiagen unter Durchführung eines DNase-Verdaus mit RNase-freier

DNase (Qiagen) oder nach folgendem modifiziertem Protokoll (Vicient und Delseny 1999):

100 mg Ausgangsmaterial wurde mit Hilfe der Kugelmühle in flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Zugabe von zweimal 1 ml Extraktionspuffer (8 M Lithiumchlorid, 2 % v/v β -Mercaptoethanol) und kräftigem Vortexen wurden die Proben über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst für 5 s bei höchster Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt. Nun erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und 4°C über 30 min. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen und 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Solubilisierungspuffer (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,5 % SDS, 2 % β -Mercaptoethanol) gelöst.

Im Anschluß wurde die Lösung in aufeinanderfolgenden Schritten mit gleichen Volumina Phenol, Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und die RNA mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 1,5 Volumen Ethanol bei -20°C ausgefällt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 30 min) wurde das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 30 μ l RNase-freiem Wasser gelöst. Wenn nötig, wurde ein DNase-Verdau mit dem RNA-Cleanup-Protokoll von Qiagen durchgeführt.

2.4.2 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung von gDNA aus Pflanzenteilen erfolgte zum einen mit dem DNeasy Plant Mini- bzw. Maxi-Kit der Firma Qiagen. Dazu wurden 100 mg bzw. 1 g Pflanzenmaterial eingewogen, in flüssigen Stickstoff gemörsert und nach den Herstellerangaben weiter aufgearbeitet. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die Kontrolle transgener Pflanzen auf das transformierte Konstrukt wurde die genomische DNA nach einem Quick-Prep-Protokoll isoliert. Dazu wurde ein im Durchmesser etwa 1 cm großes Blattstückchen in einem 2 ml Eppendorf- Tube in flüssigem Stickstoff gemörsert, 400 μ l Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS) zugegeben, ca. 3 min gevortext und anschließend 5 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Die DNA aus dem Extrakt wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol ausgefällt, nach Zentrifugation in 70 % Ethanol

gewaschen, nach Wiederholung des Zentrifugationsschrittes luftgetrocknet und anschließend in 100 µl Wasser gelöst.

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

E. coli

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 3 ml Übernachtskultur erfolgte mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Fermentas. Dazu wurden die Plasmide aus 2 ml der Kultur nach Herstellerangaben isoliert. Die isolierten Plasmide wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C bzw. für längere Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

S. cerevisiae

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 3 ml Übernachtskultur erfolgte ebenfalls mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Fermentas. Die Hefezellen der gesamten Kultur wurden sedimentiert und anschließend in 300 µl Resuspension Solution resuspendiert. Nach Zugabe von ca. 100 µl Glasbeads (0,25 – 0,5 mm, Roth) wurden die Zellen zum Aufschluss 5 min stark geschüttelt. Nachdem sich die Glasbeads am Boden abgesetzt hatten, wurden 250 µl vom Überstand abgenommen und nach Herstellerangaben weiter verarbeitet.

A. tumefaciens

Bei der Isolierung von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* wurden 4 ml einer Übernachtskultur sedimentiert und mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Fermentas nach Herstellerangaben weiter aufgearbeitet. Die Elution der DNA erfolgte allerdings aufgrund der geringen DNA-Ausbeute nur mit 20 µl Elution Buffer. Für Restriktionsansätze in einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden dann 16 µl der Plasmid-DNA eingesetzt.

2.4.4 Trennung von DNA und RNA über Agarosegele

Die Auftrennung von DNA und RNA zu analytischen Zwecken erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 1 % (w/v) Agarosegelen in 1 x TBE-Puffer (0,45 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA). Zur Visualisierung der DNA wurde der aufgeschmolzenen Gellösung vor dem Gießen $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 10 x DNA-Ladepuffer [20 % (v/v) Glycerin, 0,1 M EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF] versetzt. Je nach Gelgröße erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 80-110 Volt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem BiodocAnalyze (Whatman Biometra, www.whatman.com) unter UV-Anregung fotografiert. Als Größenstandard diente ein Fragmentgemisch (HyperLadder) der Firma Bioline (www.bioline.com).

2.4.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Detektion von elektrophoretisch aufgetrennter DNA erfolgte auf dem UV-Leuchttisch des Geldokumentationssystems BiodocAnalyze durch Anregung bei 360 nm. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit (Fragmente bis 4 kb) bzw. des QIAquick Gel Extraction Kit (Fragmente über 4 kb) der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix isoliert.

2.4.6 Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA nach Restriktionspaltungen, Polymerase-Kettenreaktionen oder Dephosphorylierungen erfolgte einerseits mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Des Weiteren wurde die DNA auch durch Natriumacetat-Ethanol-Fällung gereinigt. Dazu wurde die zu fällende DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol versetzt und bei -20°C für 1 h oder über Nacht inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in Wasser gelöst.

2.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.5.1 Restriktionsanalyse

Für Restriktionsansätze zur Kontrolle von Insertgrößen nach einer Klonierung wurden 2 µl (ca. 0,5-1 µg) Plasmid-DNA mit 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 20 µl für 60 min bei optimaler Arbeitstemperatur des entsprechenden Enzyms inkubiert. Bei präparativen Restriktionsansätzen wurden größere Mengen DNA (2-5 µg) eingesetzt. Genomische DNA (10 µg) wurde mit 50 U des jeweiligen Enzyms in einem Gesamtansatz von 100 µl bei optimaler Arbeitstemperatur des Enzyms über Nacht verdaut.

2.5.2 Ligation

Amplifizierte PCR-Fragmente mit 3'-A-Überhang wurden unter Verwendung des pGEM[®]T-Easy-Kits (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben in den T-Überhang-Vektor pGEM[®]T-Easy subkloniert. DNA-Fragmente mit korrekter Sequenz wurden durch Restriktion aus dem pGem[®]-T Easy-Vektor isoliert (siehe 2.5.1 und 2.4.5) und mit Hilfe des Quick Ligation[™] Kit (New England Biolabs) in den entsprechend geschnittenen Zielvektor ligiert. 1 µl der Ligationsansätze wurden anschließend in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte mit Hilfe der durch den rekombinanten Vektor vermittelten Antibiotikaresistenz auf LB-Agar. Die Plasmidkonstrukte wurden aus der Bakterienkultur isoliert und anschließend durch Restriktionsanalyse auf ihre Identität überprüft (siehe 2.4.3 und 2.5.1).

2.5.3 Dephosphorylierung

Um die Selbstligation von Vektoren zu verringern, wurde ein Dephosphorylierungsschritt mit der SAP (Shrimp alkaline phosphatase) der Firma Roche durchgeführt. Nach der Restriktion wurden die Fragmente in 1xSAP-Puffer mit 3 U SAP für 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 65°C.

2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus einem DNA-Strang (*template*) (Mullis et al. 1986). Der Prozess besteht aus der zyklischen Abfolge von Strangtrennung (Denaturierung), Primeranlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation) und wird 25 bis 35 Mal durchlaufen. Für analytische Zwecke wurde das *Taq* PCR Mastermix Kit der Firma Invitrogen verwendet. Bei präparativen PCR-Reaktionen wurde aufgrund der höheren Exaktheit und der hervorragenden Ausbeute ohne vorherige Protokolloptimierung der Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) verwendet. Die nachfolgende Tabelle zeigt ein generelles Schema für eine PCR.

Tabelle 2.3: Generelles Schema einer PCR. *Platinum PCR SuperMix High Fidelity: 68°C; *Taq* PCR Mastermix 72°C.

Schritt	Prozess	Zeit	Temperatur
1	initiale Denaturierung	1 min	94°C
2-36	Denaturierung	30 sec	94°C
	Annealing	30 sec	T _m -5°C
	Elongation	1 min/kb	68/72°C*
37	finale Elongation	7 min	68/72°C*

Für ortsgerichtete Mutagenesen wurde der Accuprime *pfx*-SuperMix der Firma Invitrogen verwendet. Dazu wurden Primer mit einer Schmelztemperatur von mindestens 75°C abgeleitet, die in der Mitte der Sequenz die geänderten Basenpaare trugen. Nach der PCR wurde dem Ansatz 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* zugesetzt, um den methylierten Mutterstrang zu verdauen. Der Ansatz wurde mit Hilfe der Natriumacetat-Ethanol-Fällung gereinigt (siehe 2.4.6) und 5 µl des gelösten Pellets zur Transformation chemisch kompetenter Zellen des *E. coli*-Stammes XL1 Blue verwendet.

Tabelle 2.4: Programm zur Durchführung der PCR für ortsgerichtete Mutagenesen mit dem Accuprime *pfx*-SuperMix (Invitrogen).

Schritt	Prozess	Zeit	Temperatur
1	initiale Denaturierung	1 min	94°C
2-19	Denaturierung	30 sec	94°C
	Annealing	30 sec	65°C
	Elongation	1 min/kb	68°C
20	finale Elongation	7 min	68°C

2.5.5 Semiquantitative RT-PCR

Für die cDNA-Synthese mit Oligo-dT(16)-Primern wurden 1-2 µg Gesamt-RNA und der Omniscript[®] RT Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Synthese erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Amplifizierung der cDNA-Fragmente wurden 2 µl des RT-Ansatzes in einer Standard-PCR eingesetzt.

2.5.6 Realtime-RT-PCR

In der Realtime-RT-PCR werden, beruhend auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, Nukleinsäuren amplifiziert und mittels Fluoreszenzmessungen während bzw. am Ende eines PCR-Zyklus quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgt entweder relativ, z.B. über die Normierung auf die Transkriptmenge eines nicht regulierten Gens (Rasmussen 2001), oder absolut über eine Kalibrierungskurve (Pfaffl und Hageleit 2001). Das Maß für die Quantifizierung ist der Ct-Wert, der den PCR-Zyklus angibt, bei dem ein definiertes Fluoreszenzniveau (*threshold*) über dem Hintergrundsignal (Basislinie) detektiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I zur Quantifizierung der Transkriptmengen verwendet. Dieser Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA, was zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führt, die mit der Zunahme an *template*-DNA korreliert.

Die Ableitung der verwendeten Primer (s. Anhang A1) erfolgte mit der Software Primer Express[™] (Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com). Um ihre Spezifität zu gewährleisten, wurde eine Schmelztemperatur von 59 - 60°C gewählt und, wenn möglich,

mindestens ein Primer für die Amplifikation eines Gens über eine Exon/Exon-Grenze gelegt. Dimere oder Sekundärstrukturen der Primer wurden aufgrund der unspezifischen Bindung von SYBR[®] Green I an doppelsträngige DNA vermieden. Die Größe der amplifizierten PCR-Produkte betrug 100 - 150 bp und deren Schmelztemperatur 75 - 80°C. Zur Kontrolle der spezifischen Amplifikation eines DNA-Fragmentes erfolgte nach Ablauf der PCR die Bestimmung des Schmelzpunktes des PCR-Produktes mittels Schmelzkurvenanalyse. Dazu wurde die Temperatur kontinuierlich von 60°C auf 95°C erhöht und die Fluoreszenzintensität gemessen. Wird die spezifische Schmelztemperatur des PCR-Produktes erreicht, zerfällt der DNA-Doppelstrang, SYBR[®]Green I wird freigesetzt und die Fluoreszenzintensität geht zurück. Die Amplifikation eines DNA-Fragments wird durch einen charakteristischen Peak der Schmelzkurve verdeutlicht.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Realtime-RT-PCR-Untersuchungen erfolgten mit dem Mx3005P[™] QPCR-System der Firma Stratagene (LaJolla, CA, USA) unter Verwendung des SYBR[®]Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers. Die Synthese der eingesetzten cDNA erfolgte wie unter 2.5.5 beschrieben, der cDNA-Ansatz wurde im Anschluss auf 10 ng RNA-Äquivalent μl^{-1} H₂O verdünnt. Zur Amplifikation der PCR-Fragmente wurde das in Tabelle 2.5 aufgeführte Programm verwendet.

Tabelle 2.5: Reaktionsbedingungen der durchgeführten Realtime RT-PCR-Untersuchungen.

Schritt	Prozess	Zeit	Temperatur
1	Aktivierung der <i>Taq</i> DNA-Polymerase	10 min	95°C
2-51	Denaturierung	30 sec	95°C
	Annealing	60 sec	60°C
	Elongation	30 sec	72°C
52	Schmelzkurvenanalyse		60-95°C

Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen erfolgte mit dem Programm MxPro[™] der QPCR Software (Stratagene). In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Quantifizierung der Transkriptmengen vorgenommen. Die Transkriptmengen des Zielgens (ZG) wurden dabei auf den Translations-Elongationsfaktor 1 α (Referenzgen, RG) aus *Solanum lycopersicum* unter Verwendung der Formel $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{ZG}) - \text{Ct}(\text{RG})$ normalisiert.

Beträgt die PCR-Effizienz 100 %, so verdoppeln sich die Mengen an amplifizierter DNA mit jedem PCR-Zyklus und parallel dazu die Fluoreszenzintensitäten. Die Bestimmung der PCR-Effizienz (E) der verwendeten Primerpaare erfolgte mit den normierten Fluoreszenzwerten und dem Programm LineRegPCR (Ramakers et al. 2003). Die Effizienz des Referenzgenes lag in allen Proben bei 1,95 – 2,05 und wurde auf 2 gesetzt. Die relative Transkriptmenge (T_R) des Zielgenes wurde mit den ermittelten PCR-Effizienzen des Zielgenes nach der Formel $T_R = E^{\Delta Ct}$ berechnet. Die Probe mit dem höchsten Expressionslevel (entspricht dem niedrigsten ΔCt Wert) wurde als Standard für den Vergleich der relativen Expressionslevel (E_R) genutzt und auf 100 % gesetzt. Folgende Formel fand für diese Berechnung Verwendung: $E_R = 100 * 2^{-(\Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Standard})}$. Das ermittelte relative Expressionslevel eines Gens von einer Probe entspricht dem Mittelwert aus drei technischen Replikaten.

2.5.7 Digoxigenin-Markierung von DNA

Die Markierung von DNA für Southern-Analysen erfolgte mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit der Firma Roche (Mannheim). Dazu wurden 30 ng DNA in einer PCR nach Herstellerangaben durch den Einbau von Digoxigenin-dUTP markiert. Diese markierte DNA wurde anschließend als Sonde in der DNA-Hybridisierung eingesetzt. Die Sonde wurde vor Zugabe zum Hybridisierungsansatz durch Inkubation für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.5.8 Sequenzierung und Analyse der DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte extern durch die Firma Eurofins MWG Operon (www.eurofinsdna.com). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager Suite (Sci Ed Software, www.scied.com) analysiert.

Datenbankabfragen erfolgten über die Internetseite der GenBank¹ mit den Standardeinstellungen des BLAST Programms. Die Vorhersage möglicher Transitpeptide und putativer N-Glycosilierungsstellen erfolgte mit den Programmen SignalP 3.0 und

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

NetN Glyc 1.0 des CBS Prediction Servers². Die Suche nach bekannten *cis*-Elementen innerhalb eines Promotors wurde mit der Datenbank PLACE³ durchgeführt.

2.6 Immobilisierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren

2.6.1 Immobilisierung von DNA

Der Transfer von aufgetrennter DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillarblottechnik. Dazu wurden in einer Wanne mit 2 x SSC [30 mM Natriumcitrat (pH 7,0); 0,3 M NaCl] drei Lagen Whatman 3mm-Papier auf einem umgedrehten Gelträger so angeordnet, dass die Enden der Papierlagen in den SSC-Puffer getaucht werden. Auf das Papier wurde das Gel gelegt, darüber luftblasenfrei die Nylonmembran und auf diese wiederum drei Lagen Whatman 3 mm-Papier in den Maßen des Gels. Dieser Aufbau wurde mit einem Stapel Zellstoff überschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Durch die Kapillarkräfte wurde der SSC-Puffer durch das Gel gesaugt und die Nukleinsäuren unter Erhalt des Elektrophorese-Musters auf die Membran übertragen. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Beendigung des Transfers wurden die Nukleinsäuren mit Hilfe des UV Stratalinker 1800 (Stratagene, LaJolla, CA, USA) durch UV-vermittelte kovalente Vernetzung auf der Membran fixiert.

2.6.2 Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde

Für die Hybridisierung wurde eine DNA-Sonde mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit der Firma Roche hergestellt (siehe 2.5.7). Die Membran mit der immobilisierten DNA wurde zunächst für 2 Stunden bei 42°C im Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb (Roche) vorhybridisiert. Die denaturierte Sonde wurde zum Hybridisierungsansatz dazugegeben, die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht bei 42°C. Danach wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde in mehreren Schritten gewaschen [2 x 5 min in 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei RT; 2 x 15 min in 0,5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei 68°C] und mit Maleinsäurepuffer [0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % (v/v) Tween[®]20] äquilibriert. Die Detektion der markierten Nukleinsäuren erfolgte mit dem DIG

² [http:// www.cbs.dtu.dk/services/](http://www.cbs.dtu.dk/services/)

³ <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>

Luminescent Detection Kit (Roche) nach Herstellerangaben. Die Membran wurde anschließend in Saranfolie (Roth) luftblasenfrei verpackt und zur Detektion mit einem Röntgenfilm (GE Healthcare) für 2 Stunden bei 37°C in einer lichtundurchlässigen Kassette exponiert. Nach Entwicklung des Röntgenfilms wurden die Signale visuell detektiert.

2.6.3 Southern-Blot-Analyse genomischer DNA

Für Southern-Analysen wurde genomische DNA aus jungen Tomatenpflanzen mit dem DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Der Verdau von 5 µg DNA mit 50 U der entsprechenden Restriktionsenzyme erfolgte über Nacht. Der Restriktionsansatz wurde anschließend durch Natriumacetat-Ethanol fällung gereinigt und in einem 0,8 % Agarosegel bei 20 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Blotten wurde die DNA im Gel durch 15minütige Behandlung mit 0,25 N HCl depuriniert, anschließend denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl; 30 min), neutralisiert [1 M Tris/HCl (pH 7,5), 2 M NaCl; 30 min] und abschließend in 2 x SSC äquilibriert. Der Transfer auf eine Nylonmembran und die Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde sind in den Abschnitten 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben.

2.7 Biochemische Methoden und Analytik

2.7.1 Proteinextraktion

E. coli

Für die Gewinnung löslicher Proteinextrakte wurden frisch geerntete bzw. pelletierte und bei -80°C gelagerte Bakterienkulturen in Extraktionspuffer [100 mM KPi (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin] resuspendiert. Bezogen auf das Originalvolumen der Bakterienkultur wurde dabei ein Volumenverhältnis von 1:100 eingehalten. Die resuspendierten Zellen wurden mit 100 µg·ml⁻¹ für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Ultraschallaufschluss (3 x 45 sec 60 % Duty, 65 % Power) auf Eis lysiert. Der durch anschließende Zentrifugation (10.000 x g bei 4°C) gewonnene Überstand wurde als löslicher Proteinextrakt verwendet.

Zur Isolierung unlöslicher Proteine aus *E. coli*-Zellen wurde das Zellpellet (für Gesamtproteinextraktion) bzw. der Rückstand nach Isolierung des löslichen Proteins (für denaturierende Proteinextraktion) in einem denaturierenden Extraktionspuffer [100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff (pH 8,0)] resuspendiert. Nach Ultraschallbehandlung (3 x 45 sec 60 % Duty, 65 % Power) wurde die Suspension zentrifugiert (10.000 x g bei RT) und der Überstand als unlösliche Proteinfraction verwendet.

S. cerevisiae

Frisch geerntete bzw. pelletierte und bei -80°C gelagerte Hefekulturen wurden zunächst in 4 ml Extraktionspuffer [100 mM Kaliumphosphat pH 6,0; 10 mM L-Malat, 150 mM Ammoniumsulfat, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT] resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurden ca. 5 ml Glasbeads (Karl Roth, 0,25-0,5 mm) in Kulturröhrchen gefüllt, die Zellsuspension dazugegeben und ein Metallspatel durch den Deckel bis 2 cm über den Boden des Röhrchens gebracht und mit Parafilm befestigt. Die Suspension wurde dann je zehn Mal für 30 s gevortext und zwischendurch 30 s auf Eis abgekühlt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und der Proteingehalt bestimmt.

Pflanzen

Bei *S. lycopersicum* und *N. benthamiana* erfolgte die Proteinextraktion durch Aufschluss des Gewebes in Extraktionspuffer [0,1 M Tris/HCl (pH 7,0), 0,5 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM β-Mercaptoethanol] mit Hilfe eines Glashomogenisators (VWR International, www.vwr.com) bzw. bei größeren Mengen durch Zellaufschluss im Ultra-Turrax. Nach Zentrifugation (5 min, 10.000 x g, 4°C) wurde der Überstand entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder nach einer Protamin- und Ammoniumsulfatfällung wie nachfolgend beschrieben über eine PD10-Säule (GE Healthcare) nach Herstellerangaben entsalzt.

Protaminsulfatfällung

Zur Entfernung der Nukleinsäuren aus dem Proteinextrakt wurde dieser mit einer 5 % (w/v) Protaminsulfatlösung auf eine Endkonzentration von 0,1 % Protaminsulfat eingestellt, 10 min im Eisbad gerührt und zentrifugiert. Dieser Fällungsschritt setzt die Viskosität des Proteinextraktes herab.

Ammoniumsulfatfällung

Im Anschluss an die Protaminsulfatfällung wurde der Proteinextrakt bis zu einer Sättigungskonzentration von 80 % mit festem Ammoniumsulfat versetzt, eine Stunde im Eisbad gerührt und anschließend 30 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Elutionspuffer [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0), 0,5 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol] gelöst und über eine PD10-Säule (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben entsalzt.

2.7.2 Aufkonzentrierung von Proteinen

Verdünnte Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration mit Vivaspin Concentrator Filtrationseinheiten (Ausschlussgröße 30.000 Da; Sartorius, Göttingen) durch wiederholte Zentrifugation bei 3000 x g aufkonzentriert.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Um die Konzentration von Proteinlösungen zu bestimmen, wurden 2-20 μ l Proteinlösung nach der Methode von Bradford (1976) mit 1 ml Bradford-Reagenz [0,065 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 in 5 % Methanol, 10 % (v/v) Phosphorsäure] versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gegen einen entsprechenden Leerwert im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer BSA-Eichkurve ermittelt.

2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-PAGE ist es möglich, Proteine in ihrer denaturierten Form nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (Laemmli 1970). Es wurden ausschließlich Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 11 % verwendet, die Zusammensetzung ist in Tabelle 2.5 aufgelistet. Vor dem Auftragen wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Proteinprobenpuffer [0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 5 mM EDTA, 15 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol] gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA für 60-90 min durchgeführt.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele (Angaben für 2 Gele)

Lösung	Sammelgel	Trenngel (11 %)
Acrylamidlösung	0,7 ml	3,7 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,5 ml	-
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	2,5 ml
Wasser	3,0 ml	3,8 ml
10 % APS	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

2.7.5 Färbung von Proteinen

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden Gele, die nicht für die Immobilisierung der Proteinbanden für eine nachfolgende Western-Blot-Analyse verwendet wurden, mit Coomassie-Lösung [0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol] durch Kochen für 2-3 min in der Mikrowelle gefärbt. Nach Entfärben des Hintergrundes durch mehrmaliges Aufkochen in Entfärbelösung [10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol] wurden die Gele im Geldokumentationssystem BioDocAnalyze (Whatman Biometra) unter Weißlicht fotografiert oder mit einem Scanner (HP Scanjet 3970) eingelesen.

2.7.6 Western-Blot-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch ein Nass-Blotverfahren mit Hilfe des XCell II Blotmoduls (Invitrogen) aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Invitrogen) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde bei konstant 30 V. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in TBS [100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl] gespült und für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung [5 % (w/v) Trockenmilchpulver (BioRad) in TBS] inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (primärer AK), der 1:1000 in Blockierungslösung verdünnt wurde, erfolgte unter Schütteln über Nacht bei 4°C. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) in TBST [TBS (pH 7,5) mit 0,05 % (v/v) Tween-20] entfernt. Anschließend wurde die Membran 3 mal 5 min mit TBS gewaschen und dann mit dem 2. Antikörper (sekundärer AK), der ebenfalls 1:1000 mit Blockierungslösung verdünnt wurde, zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um Anti-IgG1-Konjugate mit alkalischer Phosphatase (AP) zur enzymatischen colorimetrischen Detektion. Nach erneutem Waschen mit TBST (3 x 5min) wurde die Membran 5 min in TBS (pH 9,5) inkubiert und anschließend mit AP-Substratpuffer [TBS (pH 9,5), 50 mM MgCl₂] äquilibriert. Die Farbreaktion zur Detektion der AP wurde durch Zugabe von 0,16 mg ml⁻¹ 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und 0,32 mg ml⁻¹ p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) gestartet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen der Membran in destilliertem Wasser gestoppt. Das Signalmuster wurde zur Dokumentation mit einem Scanner (HP Scanjet 3970) eingelesen.

2.7.7 CGT-Aktivitätstest

Um die Enzymaktivität der pflanzlichen bzw. rekombinaten CGT zu bestimmen, wurde das Protein in Standardassays mit 20 mM Chlorogensäure und 5 mM Glukarsäure in 100 mM MES-Puffer (pH 6,0) in einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert (30°C, 450 rpm). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Trifluoressigsäure abgestoppt und ausgefallene Proteine durch Zentrifugation (14000 x g, 5 min, RT) sedimentiert. Der

Überstand wurde dann mittels HPLC-Analyse auf die enzymatische Bildung von Kaffeoylglukarat untersucht (vgl. 2.7.10).

2.7.8 Hemmversuche mit Phenylmethylsulfonylfourid (PMSF)

Um zu untersuchen, inwieweit der Serin-Carboxypeptidase spezifische Inhibitor PMSF die CGT-Aktivität hemmen kann, wurde PMSF bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zu den Enzymassay-Ansätzen gegeben und diese für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Analyse des gebildeten Kaffeoylglukarats erfolgte wie in Abschnitt 2.7.10 beschrieben.

2.7.9 Extraktion der Kaffeesäureester

Die Kaffeesäureester Chlorogensäure und Kaffeoylglukarat können in Blättern der Tomate mittels analytischer HPLC nachgewiesen werden. Dazu wurden die Proben in 80 % (v/v) Methanol mit Hilfe von Zirkonia Beads [1 mm, (Biospec Products; Bartlesville OK, USA)] iam Bead Beater (Biospec Products, www.biospec.com) für 2 min homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot des Überstandes für die Analyse und Quantifizierung mittels HPLC eingesetzt.

2.7.10 Analytische HPLC

Zur HPLC-Analyse wurde die ALLIANCE HT HPLC der Firma Waters verwendet. Aliquots der Enzymassays (20-40 µl) wurden auf eine 5 µm ALLIANCE HPLC C18 Säule (200 x 4,6 mm) injiziert. Dabei wurde ein 15minütiger linearer Gradient von 10 bis 25 % Acetonitril in 1,5 % Phosphorsäure bei einer Flussrate von 1 ml·min⁻¹ eingesetzt. Die Detektion und Identifizierung der Substanzen erfolgte im Photodioden-Array-Detektor (PDA) bei einer Wellenlänge von 330 nm mit Hilfe externer Standards.

2.7.11 Colorimetrischer Lipase-Aktivitätstest

Für den Lipasetest wurde partiell gereinigte CGT-Enzymlösung mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) auf Konzentrationen von 0 – 0,5 mg·ml⁻¹ verdünnt.

Die Lipaseaktivität wurde colorimetrisch durch Messung des freigesetzten p-Nitrophenol (p-NP) aus p-Nitrophenyllaurat (p-NPL) bestimmt (Ruiz et al. 2004). Dazu wurden die Enzymlösungen für 15 min bei 37°C mit der Reaktionslösung [1 mM p-NPL, 5 % (v/v) 2-Propanol, 0,6 % (v/v) Triton X-100, 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)] inkubiert und dann die Extinktion bei 405 nm gemessen. Die Menge an freigesetztem p-NP wurde mit Hilfe einer Eichgerade quantifiziert. Als Kontrollenzym fand eine Lipase aus *Candida rugosa* (CrLip, Sigma-Aldrich) Verwendung.

2.8 Partielle Proteinreinigung

Alle chromatographischen Trennschritte wurden mit einer Äktaexplorer FPLC-Anlage bei Raumtemperatur durchgeführt. Die pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur, die Dimensionen der Säulen sind in Klammern angegeben (mm/cm). Vor der chromatographischen Trennung wurden alle Proben zentrifugiert (10000 x g, 10 min, 4°C) und die Säulen mit dem entsprechenden Elutionspuffer äquilibriert. Das Reinigungsprotokoll umfasste folgende Schritte:

- Mechanischer Zellaufschluss mit Hilfe eines Ultra-Turrax im Extraktionspuffer [0,1 M Tris/HCl (pH 7,0); 0,5 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol] unter Zugabe von Polyclar AT und anschließendem einstündigen Rühren im Eisbad
- Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (10.000 x g, 30 min, 4°C)
- Nukleinsäurefällung aus dem Überstand mit 0,1 % (w/v) Protaminsulfat unter Rühren für 1 h im Eisbad
- Zentrifugation zur Abtrennung präzipitierter Nukleinsäuren (10.000 x g, 30 min, 4°C)
- Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 80 % unter Rühren im Eisbad
- Zentrifugation zur Sedimentierung des Proteins (10.000 x g, 30 min, 4°C), Lösen des Pellets in Elutionspuffer [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0); 0,5 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin]
- Entsalzung an Sephadex G-25

- Anionenaustauschchromatographie der vereinigten aktiven Fraktionen an Q-Sepharose FF Säule [(50/20), GE Healthcare]
linearer Gradient mit Puffer A [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0), EDTA, 10 % (v/v) Glycerin] und Puffer B [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0), EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 M NaCl] von 0 bis 100 % B; Flussrate: 1 ml·min⁻¹
- Aktive Fraktionen wurden vereinigt und die Proteine mit Ammoniumsulfat gefällt (80% Sättigung; 30 min bei 4°C)
- Sedimentierung des Proteins (10.000 x g, 30 min, 4°C), Lösen des Pellets in Elutionspuffer [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0); 0,5 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin]
- Hydrophobe Interaktionschromatographie Phenyl Sepharose FF Säule [(16/10), GE Healthcare]
linearer Gradient mit Puffer A [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0); 0,5 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 M Ammoniumsulfat] und Puffer B [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0), EDTA, 10 % (v/v) Glycerin] von 0 bis 100 % B; Flussrate: 1ml·min⁻¹
- Gelfiltration an Superdex G75 [(16/60), GE Healthcare]
Puffer A [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0), EDTA, 10 % (v/v) Glycerin]; Flussrate: 1 ml·min⁻¹
- Anionenaustauschchromatographie der vereinigten aktiven Fraktionen an MonoQ Säule [(10/10), GE Healthcare]
linearer Gradient mit Puffer A [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0), EDTA, 10 % (v/v) Glycerin] und Puffer B [0,02 M Tris/HCl (pH 7,0), EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 M NaCl] von 0 bis 100 % B; Flussrate: 1 ml·min⁻¹

2.9 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die 5'RACE-PCR dient zur Amplifizierung von 5'-cDNA-Sequenzen ausgehend von genspezifischen Primern gegen eine bekannte interne Sequenz und eines Primers gegen einen Adaptersequenz, die im Verlauf der cDNA-Synthese durch Ligation am 5'-Ende angefügt wird. Zunächst werden 5 µg RNA aus 4 Tage alten Tomatenkeimlingen dephosphoryliert, um abgebaute RNA bzw. „nicht-mRNA“ von den nachfolgenden Ligationen auszuschließen. Intakte mRNA ist während dieses Schrittes durch die 5'-Kappe vor Dephosphorylierung geschützt. Die dephosphorylierte RNA wird anschließend einer

TAP- (*tobacco acid pyrophosphatase*) Behandlung zur Entfernung der 5'-Kappe unterzogen. Nach der Ligation mit dem Adapter-Oligonukleotid und der Umschreibung der RNA in cDNA wurde eine PCR mit einem genspezifischen Primer für die CGT (GSP_R1 bzw. GSP_R2, siehe Anhang A1) und dem UPM-Primer durchgeführt. Die erhaltenen Fragmente wurden anschließend in den Vektor pGemTeasy (Promega) kloniert, in *E. coli* transformiert und isolierte Plasmide sequenziert.

2.10 Genome Walking

Um die Promotorsequenz *upstream* der *SICGT* zu identifizieren, wurde ein *Genome Walking* mit dem GenomeWalker Kit von Clontech (www.clontech.com) nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch diese Technik ist es möglich, unbekannte genomische DNA-Sequenzen ausgehend von einer bekannten Nukleotidsequenz zu isolieren. Begonnen wird mit der Herstellung einer GenomeWalker-Bank. 25 µg genomische DNA wurden über Nacht bei 37°C mit Restriktionsenzymen, die glatte Enden generieren (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *SspII*) verdaut. Nach der Reinigung der DNA erfolgte die Ligation des GenomeWalker Adapters an das 5'- und 3'-Ende der genomischen DNA-Fragmente. Anschließend wurde eine PCR mit einem genspezifischen Primer (GenWalk1) und einem Primer für den GenomeWalker Adapter (AP1) durchgeführt. Um die Spezifität zu erhöhen, folgte im Anschluss eine nested PCR mit dem genspezifischen Primer GenWalk2 und dem Primer AP2 (siehe Anhang). Für die PCR wurde der Platinum PCR Supermix High Fidelity der Firma Invitrogen verwendet. Die größten erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pGem[©]-T Easy (Promega) kloniert und durch Sequenzierung analysiert.

2.11 Heterologe Proteinexpression

2.11.1 Expression in *E.coli*

Für die bakterielle Expression der *SICGT* kam das Vektorsystem pET28a (Novagen, Darmstadt) zum Einsatz. Dazu wurde zunächst die *SICGT* cDNA-Sequenz ohne das putative Signalpeptid mit den Primerpaaren 5'pET1/3'pET1 und 5'pET2/3'pET2 in einer PCR amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGem[©]-T Easy subkloniert. Nach

Sequenzierung wurde der korrekte Leserahmen einmal als *XbaI-NotI*-Fragment zur Fusionierung mit einem C-terminalen His-tag in den Vektor pET28 kloniert. Des Weiteren erfolgte eine Klonierung als *BamHI-NotI*-Fragment in den Vektor pET28a zur Fusionierung der Sequenz mit einem N-terminalen His-tag. Zur Transformation wurden *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL Zellen (Stratagene)genutzt.

Für die Proteinexpression wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer Übernachtskultur beimpft und unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression der *SICGT*-cDNA induziert. Die Zellen wurden für weitere 4 h bei 37°C inkubiert und nachfolgend durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C sedimentiert. Die Proteinextraktion erfolgte wie im Abschnitt 2.7.1 beschrieben.

2.11.2 Expression in *S. cerevisiae*

Die Expression der *SICGT* in *S. cerevisiae* erfolgte mit Hilfe des Vektorsystems pDIONYSOS (Stehle, Stubbs et al. 2008). Dazu wurde zunächst die *SICGT* cDNA-Sequenz mit den Primerpaaren 5'pDIO/3'pDio in einer PCR amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGem[©]-T Easy subkloniert. Nach Sequenzierung erfolgte die Klonierung als *HindIII/XbaI*-Fragment in den Expressionsvektor pDIONYSOS und die Transformation in *S. cerevisiae* INVSc1. Die Kozak-Sequenz (Kozak 1983) sowie die 5'UTR-Konsensus Sequenz hoch exprimierter *S. cerevisiae*-Gene (Hamilton et al. 1987) wurden durch *forward*-Primer mit entsprechenden Sequenzüberhängen in PCR-Ansätzen an die *SICGT* cDNA angefügt.

Für die heterologe Expression wurde eine 50 ml - Mediummangelkultur ohne Uracil [*drop out* Medium ohne Uracil (Sigma), 6,7 g l⁻¹ synthetischer Hefeextrakt ohne As (Sigma)] mit 4 % Raffinose (w/v) als Kohlenstoffquelle mit dem jeweiligen rekombinaten Hefestamm beimpft und für 48 h bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1500 x g, 5 min, RT) pelletiert und anschließend in Induktionsmedium [*drop out* Medium ohne Uracil (Sigma), 6,7 g l⁻¹ synthetischer Hefeextrakt ohne As (Sigma), 4 % Galactose] resuspendiert, wobei eine OD₆₀₀ von 1,5 eingestellt wurde. Nach weiterer Inkubation für 30 h bei 30°C unter Schütteln erfolgte die Ernte der Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C. Bis zur weiteren

Verwendung erfolgte eine Lagerung bei -80°C , die Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben.

2.11.3 Transiente Expression in *N. benthamiana*

Für die transiente Überexpression der *SICGT* in *N. benthamiana* wurde ein Vektor konstruiert, in dem die Expression der *SICGT* der Kontrolle durch den starken Promotor der kleinen Untereinheit der RUBISCO unterliegt. Es wurde sowohl ein Konstrukt mit einem C-terminalen His-tag als auch ein Konstrukt ohne His-tag hergestellt. Für die Expression mit His-tag wurde der Leserahmen und 8 Nukleotide der 5'UTR unter Insertion der Schnittstellen für *XbaI* und *NotI* in einer PCR amplifiziert, in den Vektor pGem[©]-T Easy subkloniert und sequenziert. Die korrekte Sequenz wurde als *XbaI/NotI* in den Vektor pImpact1.1-tag subkloniert, die gesamte Expressionskassette nach *AscI/PacI*-Restriktionsverdau in den Expressionsvektor pBINPLUS überführt und in *A. tumefaciens* GV2260 transformiert. Für das Expressionskonstrukt ohne His-Tag wurde der Subklonierungsvektor pImpact 1.1 verwendet, die Klonierung und Transformation erfolgte wie beschrieben. Als Kontrolle wurden *A. tumefaciens* GV2260 mit dem leeren pBINPLUS transformiert.

Die Transformation von etwa 10 Wochen alten Tabakpflanzen mit Agrobakterien, die einen der drei Expressionsvektoren trugen, erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben. Nach 5 Tagen wurden die Blätter geerntet und entweder wie unter 2.7.1 beschrieben verarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.12 Analyse der Reporterexpression im Tabak-Expressionssystem

Nach Proteinextraktion wie unter 2.7.1 beschrieben wurden 25 μl des Proteinextraktes mit 225 μl Reaktionspuffer gemischt und 50 μl zu 950 μl 0,2 M $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ gegeben. Diese Probe diente als Nullwert. Nach 120 minütiger Inkubation des übrigen Reaktionsansatzes wurden auch hier 50 μl zu 950 μl 0,2 M $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ pipettiert. 200 μl der abgestoppten Reaktionsansätze wurden in Mikrotiterplatten gegeben und die Fluoreszenz gemessen (Anregungswellenlänge 360 nm, Emissionswellenlänge 460 nm, CytofluorII, Biossearch, Bedford, USA). Die GUS-Aktivität wurde durch Vergleich mit einer Methylbelferon-

Eichkurve ermittelt. Der höchste ermittelte Wert wurde mit 1 gleichgesetzt und durch alle ermittelten Werte geteilt. Die CGT-Aktivität der gleichzusetzenden Proben wurde dann mit den errechneten Faktoren multipliziert, um die GUS-Aktivität in allen Proben gleichzusetzen und somit auch die CGT-Aktivität zu quantifizieren.

2.13 Cytologische Methoden

2.13.1 Fixierung und Einbettung in Polyethylenglycol (PEG)

Die mit CGT-His-tag-Fusionskonstrukt transformierten Tabakblätter wurden vor der Fixierung in etwa 4 x 4 mm große Stücke geschnitten, für mind. 15 min unter Vakuum in Fixativ [4 % Paraformaldehyd (w/v), in PBS; 0,1 % (v/v) Triton-X 100] infiltriert und anschließend für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS [1,5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 135 mM NaCl, 3 mM KCl (pH 7,0)] erfolgte eine Dehydrierung der Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe und eine anschließende schrittweise Infiltration mit PEG1500. Ein detailliertes Ablaufschema ist in Tabelle 2.7 zu finden. Die infiltrierten Proben wurden in Einbettungsformen in reinem PEG1500 eingebettet, über Nacht bei RT ausgehärtet und bei 4°C gelagert.

Tabelle 2.7: Einbettung von *N. benthamiana* - Blättern in PEG

Lösung	Inkubationszeit	Temperatur
Fixativ	2 h	RT
PBS	2 x 15 min	RT
10 % (v/v) Ethanol	30 min	RT
30 % (v/v) Ethanol	60 min	RT
50 % (v/v) Ethanol	60 min	RT
70 % (v/v) Ethanol	über Nacht	RT
90 % (v/v) Ethanol	30 min	RT
100 % Ethanol	30 min	RT
100 % Ethanol	60 min	55 °C
Ethanol:PEG [3:1 (v/v)]	60 min	55 °C
Ethanol:PEG [1:1 (v/v)]	60 min	55 °C
Ethanol:PEG [1:3 (v/v)]	60 min	55 °C
PEG	60 min	55 °C
PEG (offene Gefäße)	60 min	55 °C

2.13.2 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin

Nach Reinigung mit 70 % Ethanol wurden 60 µl Poly-L-Lysinlösung (Sigma) auf die Oberfläche eines Objektträgers pipettiert und ein zweiter mit der Oberseite nach unten so auf dem ersten platziert, dass sich die Lösung luftblasenfrei zwischen den Objektträgern verteilt. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger durch Flottieren in destilliertem Wasser getrennt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.13.3 Immunmarkierung

Zunächst wurden mit einem Rotationsmikrotom Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt und mit Hilfe eines Tropfens 40 % (w/v) PEG6000 in PBS auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger übertragen. Das Einbettungsmedium (PEG) wurde durch 10 minütiges Waschen in PBS herausgelöst. Freie Aldehydgruppen wurden durch 5minütige Behandlung mit 0,1 M NH₄Cl in PBS blockiert. Nach nochmaligem Waschen (5 min) in PBS erfolgte die Blockierung freier unspezifischer Bindungsstellen durch 30minütige Inkubation in Blockierungslösung [5 % (w/v) BSA in PBS]. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit 250 µl des primären Antikörpers (1:500 in Blockierungslösung) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 3 maligem Waschen mit 0,1 % BSA in PBS und einmaligem Waschen mit 1 % BSA in PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:500 in Blockierungslösung) für 90 min bei 37°C ebenfalls in einer feuchten Kammer. Dieser und alle nachfolgenden Schritte erfolgten unter Lichtausschluss, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte entweder direkt mit Citifluor/Glycerol (Plano, Wetzlar) eingeschlossen und mit Nagellack versiegelt oder für Gegenfärbungen weiterverwendet.

Zur Kontrolle erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, Molecular Probes), einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, der zum Nachweis von Zellkernen geeignet ist. Auch die DNA in Plastiden und Mitochondrien wird durch DAPI angefärbt. Die Objektträger mit den immunmarkierten Schnitten wurden für 15 min in einer dunklen Küvette in DAPI-Lösung (0,1 µg·ml⁻¹ in PBS) inkubiert und

anschließend zweimal 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Citifluor/Glycerol eingeschlossen und mit Nagellack versiegelt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte durch Anregung mit UV-Licht (350 nm).

2.13.4 Mikroskopische Analyse und Bildbearbeitung

Die immunmarkierten und gefärbten Schnitte wurden am AxioImager Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) ausgewertet. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei Blauanregung (AlexaFluor488, grüne Fluoreszenz bei 495 nm) und UV-Anregung (DAPI, blaue Fluoreszenz bei 350 nm).

2.14 Statistische Auswertungen

Mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2007 wurde anhand des „Zweistichproben-t-Tests: Gleicher Varianzen“ überprüft, ob beobachtete Unterschiede zweier Meßreihen signifikant sind. Als hypothetische Differenz der Mittelwerte wurde dabei 0 angenommen, die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5 % (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Statistische Signifikanz liegt vor, wenn der errechnete p-Wert der Untersuchung kleiner ist als das Signifikanzniveau von 0,05.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung der *SICGT*

3.1.1 Reinigung der *SICGT*

Proteinextrakte aus den Keimblättern von *S. lycopersicum* zeigen eine hohe CGT-Aktivität (Strack und Gross 1990). Um die *SICGT* zu reinigen, wurden 3,5 g mit 80 % Ammoniumsulfat ausgefälltes Protein aus 14 Tage alten Kotyledonen einer Kombination von chromatographischen Reinigungsschritten unterzogen, die Adsorptions-, Ionenaustausch- und Größenausschlusstechniken beinhalteten. Tabelle 3.1 zeigt eine Zusammenfassung der einzelnen Reinigungsschritte.

Tabelle 3.1: Reinigungsschema der *SICGT* aus *S. lycopersicum*

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (nkat)	Spezifische Aktivität (nkat [mg protein] ⁻¹)	Anreicherung (-fach)	Ausbeute (%)
Sephadex G-25	3500	145	0.041	1	100
Q-Sepharose	351	100	0.28	7	68
Phenylsepharose	17.7	30	1.7	41	21
Superdex G-75	2.7	21	7.8	188	14
Mono Q	0.53	12.8	24.2	585	9

Es gelang, die CGT mit 585facher Anreicherung und 9 % Ausbeute an der Gesamtaktivität beinahe bis zur Homogenität zu reinigen. Von allen Reinigungsschritten wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.1). Das gereinigte Protein in Spur 6 zeigt zwei Banden, wobei die Hauptbande ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa besitzt. Die sehr schwache Bande wurde vorläufig als mögliche glycosylierte Form des Proteins angesehen.

Um Sequenzinformationen über die gereinigte CGT zu erhalten, wurde die Proteinbande aus Spur 6 ausgeschnitten, einem Trypsin-Verdau unterzogen und mittels Massenspektrometrie sequenziert (Dr. Manfred Nimtz, GFB Braunschweig). Mit Hilfe dieser Technik gelang es, vier Peptide (siehe Tabelle 3.2) zu ermitteln. Datenbankabfragen mit

diesen Peptiden zeigten Homologien zur Enzymfamilie der Lipasen/Esterasen (NCBI, BlastX). Das Peptid CGT1 enthält außerdem das GDSL-Motiv, welches alle Mitglieder der GDSL-Lipasen besitzen.

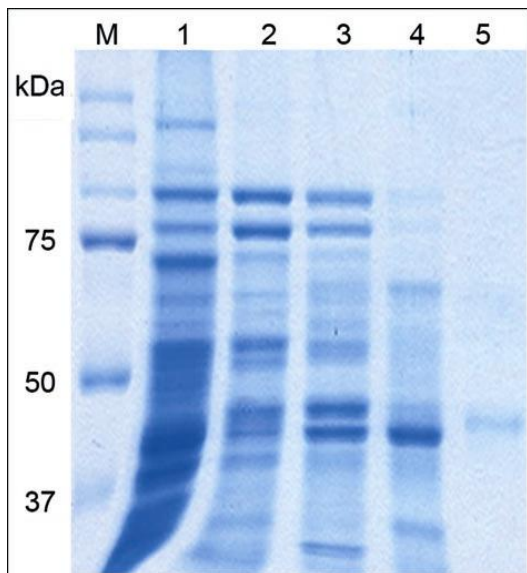


Abbildung 3.1: SDS-PAGE der SICGT-Reinigungsschritte aus 14 Tage alten Tomaten-Kotyledonen. *M* Precision Plus Protein™ Standard Dual Color, *1* Rohprotein, über Sephadex G-25 entsalzt, *2* Q-Sepharose, *3* Phenylsepharose, *4* Superdex G-75, *5* Mono-Q

Tabelle 3.2: Sequenzen der ermittelten CGT-Peptide. Die Aminosäuren des GDSL-Motivs sind rot markiert, die Konsensus-Sequenz für N-Glykane ist unterstrichen

Peptid-Name	Sequenz
CGT1	LFQFDGDSLSDTGNDGTR
CGT2	CCGLGGEYNTES
CGT3	ACADPSSYLSWDGSHLTQK
CGT4	LPYGMNFIYQ <u>NAT</u> GR

3.1.2 Isolation der cDNA

Aus den Sequenzen CGT1 und CGT2 wurden degenerierte Primer abgeleitet, welche dann in einer RT-PCR in Kombination mit einem OligodT-Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt wurden. Die Peptidsequenzen CGT3 und CGT4 erwiesen sich als ungünstig für die Primerableitung, da hier zu viele Aminosäuren mit stark degenerierter Codierung enthalten waren. Eine Tabelle der abgeleiteten Primer findet sich im Anhang. Als Template für die RT-PCR diente cDNA aus 4 Tage alten Tomatenkeimlingen. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden in den Klonierungsvektor pGEM©-T Easy (Promega) ligiert und Sequenzanalysen unterzogen.

Die Sequenz des Klons CGT2_1_3 (aus Keimlingsprobe 4d, Peptidsequenz CGT2, Primer CGT2_1) zeigte ebenfalls wie die erhaltenen Peptidsequenzen eine starke Identität zum *lipase-like protein* (At5G03980) aus *A. thaliana*. Auch konnte nach Übersetzung der DNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz die Peptidsequenz CGT2 in diesem 177 bp großen Fragment gefunden werden. Da in dem Leserahmen des isolierten Fragmentes ein Stopcodon vorhanden war, schien es sich um das 3'-Ende der *SICGT* zu handeln.

Um eine *full length* cDNA zu isolieren, wurde eine 5'RACE-PCR durchgeführt. Es gelang die Amplifizierung eines 966 bp großen DNA-Fragmentes, das den fehlenden 5'-Bereich des Leserahmens des unvollständigen cDNA-Klones enthielt (Abb. 3.1).

```

1  CACTAGTGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGAAATCATGGCATTGGG
81  AATGAGAGTGGTAGTGCTTCATCTCTTAATCAGTTTGTGTGCTTCTTCAACTGATCAAAGGAGATGATGATATGGTAATAA
161  AGCTTGAAGAACCGAAATTGAAGAAATGCGGAATTGACAGAATTTTTCAGTTTGGTGATTCACCTTCCGATCTGGAAC
241  TGTTTGAGAGAGAGCTATTGTGGAGCTCAAACATAAACCAGAAACTTCCTTACGGAATGAATTTTACCAGAACGCAAC
321  TGGACGTTGTTCTGATGGATTCATCATCCTTGATTACATAGCGATGGAATGTGGTCTTCCTCTCCTAAATCCGTCCTTGG
401  AAGAAATGCAGATTTAGCCATGGTGTGAATTTCCGCGTATCAGGAGCTACTGCTTTATCAGCGGAATACCTCATATCG
481  AGGGACATCGCTATGTCTTTCACAAACAGTTCATTAGTGTTCAGATGCGATGGATGCTCTTCTTATTTCAAATCTGTTTG
561  CTCCAATGATTGCGCAAAATATTTGGAAAATTCACCTTCTTAATTGGAGAAATCGGAGGAGATGACGTTACTTATGGAT
641  TTAAGCAAGGCAAAACCCATAGAGGAGGTGCGAAGAATAGTGCTGATATTGTGAAAAACATCATTCACTCTGTTAGAACA
721  GTCATTGGTTTTGGGGCTACTCGAATTTTAGTTCCTGGTAATTTTCCTTCAGGTTGTTTCCCAATTATACTAACGTTATA
801  CATGAATGATTCCCTCAACTGTCTACGATGAGTACCATTGCGCGGAAGAATGGAACAATTTTACAATCTCTTATAACAATC
881  TTCTGCAACAATCCATTCATGAGCTGAACGAAGAGTATCCAAACATTTCAATTATTTACGGCGATTACTACAATGCCTAT
961  TACTGGCTTCTGCGAAATGCTGCTCTTGGATTCAATAAAAAGACACTACAGATATCATGTTGTGGAATAGGAGGAGA
1041 ATATAACTACACCGAATCCAGGAGATGTGGTAAGCCAGGAGCTGAAAAGCCTGTGCGACCCGAGTAGTTACTTTAAGTT
1121 GGGATGGAAGTCATTTGACACAAAAGGCATATGGTTGGATAACAAAATGGCTAATTGATGACATTTTACCCCAATTGAAC
1201 TGTCGTGTTTGA

```

Abbildung 3.2 Nukleotidsequenz des 5'Race-Fragmentes. Das Startcodon ist unterstrichen. Die neu dazugewonnene 5'-Sequenz ist rot dargestellt.

Aus den durch RT-PCR mit degenerierten Primern und 5'Race-PCR erhaltenen Sequenzinformationen wurden Primer für die Amplifizierung des gesamten Leserahmens abgeleitet (CGTcom_F, CGTcom_R). Mit Hilfe dieser Primer konnte durch RT-PCR an cDNA aus Tomatenkeimlingen eine cDNA isoliert werden, die eine codierende Sequenz von 1143 bp umfasst.

3.1.3 Heterologe Expression von *SICGT*

Heterologe Expression in *E. coli*

Die funktionelle Expression von *SICGT* sollte zunächst in *E. coli* erfolgen. Die codierende Sequenz der *SICGT*-cDNA wurde ohne das putative Signalpeptid unter Hinzufügen eines C- bzw. N-terminalen 6 x His-tag, um eine spätere Reinigung des heterolog exprimierten Proteins mittels Metallaffinitätschromatographie zu ermöglichen, in den Expressionsvektor pET28a(+) (Novagen, Darmstadt) kloniert und in BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen (Stratagene, LaJolla CA, USA) transformiert. Dieser Stamm enthält zusätzliche Genkopien für die in *E. coli* seltenen tRNAs argU (AGA, AGG), ileY (AUA) und leuW (CUA), die häufig den Translationsprozess rekombinanter Proteine in *E. coli* limitieren.

Die Expression rekombinanter Gene ist in diesem System durch Zugabe von IPTG induzierbar. Allerdings ist die Expression auch von äußeren Faktoren, z. B. Kulturtemperatur und Dauer der Expression abhängig, daher müssen diese Faktoren von Fall zu Fall immer wieder neu empirisch bestimmt werden. Dazu wurden zwei verschiedene Temperaturen (28°C und 37°C) sowie unterschiedliche IPTG-Konzentrationen (0, 0,2 und 1 mM IPTG) bei einer Induktionsdauer von 4 Stunden getestet. Verwendet wurden 5 ml-Kulturen, die nach der Induktionsphase zur Extraktion der löslichen und unlöslichen Proteine genutzt wurden. Die Proteinextrakte wurden auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und die aufgetrennten Proteine anschließend auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Anschließend wurde das rekombinante Protein im Western Blot durch einen monoklonalen Anti-His-tag-Antikörper nachgewiesen.

Die Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch die Expression der *SICGT* einmal mit C-terminalem (CGT-C) und einmal mit N-terminalem 6 x His-Tag (CGT-N) bei einer Induktion mit 1 mM IPTG und einer Induktionsdauer von 4 h bei 37°C. Es konnte lediglich im nicht-löslichen Proteinextrakt des Expressionskonstruktes mit N-terminalem His-tag rekombinantes Protein nachgewiesen werden. Unter keiner der getesteten Bedingungen war nach Coomassie-Färbung im SDS-Gel eine Proteinbande der CGT erkennbar. Auch konnte keine Aktivität für die CGT nachgewiesen werden.

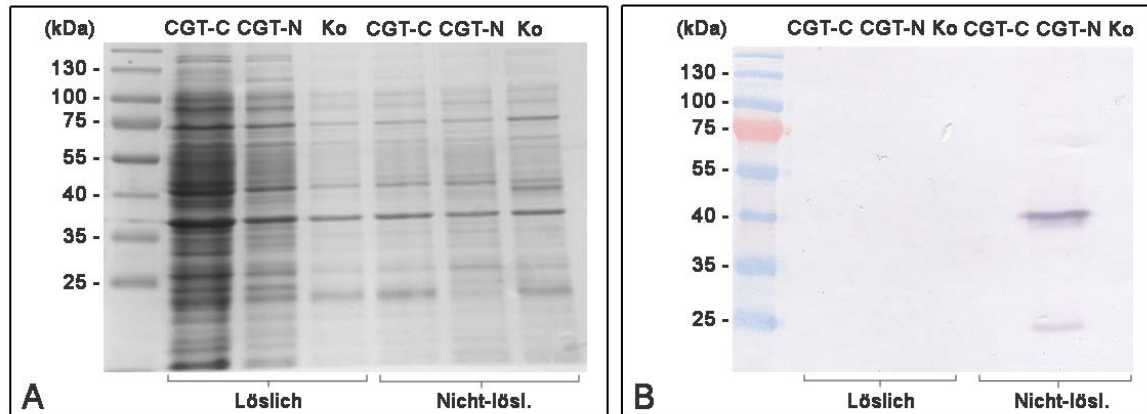


Abbildung 3.3: Heterologe Expression von SICGT im *E. coli*-System pET28a/BL21-CodonPlus (DE3) RIL. Dargestellt ist eine SDS-PAGE (A) und eine Western Blot-Analyse mit einem Anti-His-tag-Antikörper (B) von Proteinextrakten aus *E. coli* mit den Expressionskonstrukten pET28a-SICGTC (CGT-C) mit C-terminalem His-Tag, pET28a-SICGTN (CGT-N) mit N-terminalen His-Tag bzw. dem Vektor pET28a (Ko) nach 4stündiger Induktion bei 37°C mit 1 mM IPTG. Je Spur sind 20 µg des löslichen und des nicht-löslichen Extraktes aufgetragen.

Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Da die SICGT, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, nicht funktionell in *E. coli* exprimiert werden konnte, wurde als nächste Strategie die Expression in *S. cerevisiae* gewählt. Die Hefe *S. cerevisiae* ist ein eukaryotischer, genetisch gut charakterisierter Organismus, der häufig für die Expression eukaryotischer Proteine genutzt wird. Auch ist sie im Gegensatz zu *E. coli* in der Lage, posttranslationale Modifikationen und Prozessierungen von Proteinen ähnlich wie in anderen Eukaryoten auszuführen. Für die Expressionsversuche wurde der *high-copy* Hefeexpressionsvektor pDIONYSOS genutzt, der die heterologe Expression von Proteinen unter der Kontrolle des starken Galaktose-induzierbaren GAL1-Promotors erlaubt. Dieser Vektor wurde aus dem Vektor pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe) durch Einbau des *leu2-d*-Gens abgeleitet, und erreicht in *leu2*-defizienten Hefestämmen eine hohe Kopienzahl (Stehle 2009).

Zunächst wurde der vollständige codierende Bereich der *SICGT*-cDNA unter Insertion einer Consensussequenz für Hefen [AAA AAA ATG G, (Hamilton, Watanabe et al. 1987)] in den Vektor pDIONYSOS kloniert und in *S. cerevisiae* INVSc1 transformiert. Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden 50 ml Induktionsmedium mit einer Übernachtskultur des Konstruktes angeimpft. Nach einer 36stündigen Induktionsphase bei 30°C wurden die löslichen Proteine extrahiert und für Aktivitätstests verwendet. Dabei konnte eine sehr geringe CGT-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Die

Identität des Reaktionsproduktes wurde hierbei aufgrund des Absorptionsspektrums der erhaltenen Peaks bestimmt.

Da die Optimierung des Hefeexpressionssystems sehr zeit- und kostenaufwendig ist, wurde von weiteren Expressionsversuchen in diesem Organismus abgesehen. Die weitere heterologe Expression sollte durch transiente Transformation von *N. benthamiana*, wie in Kapila et al. (1997) beschrieben, erfolgen.

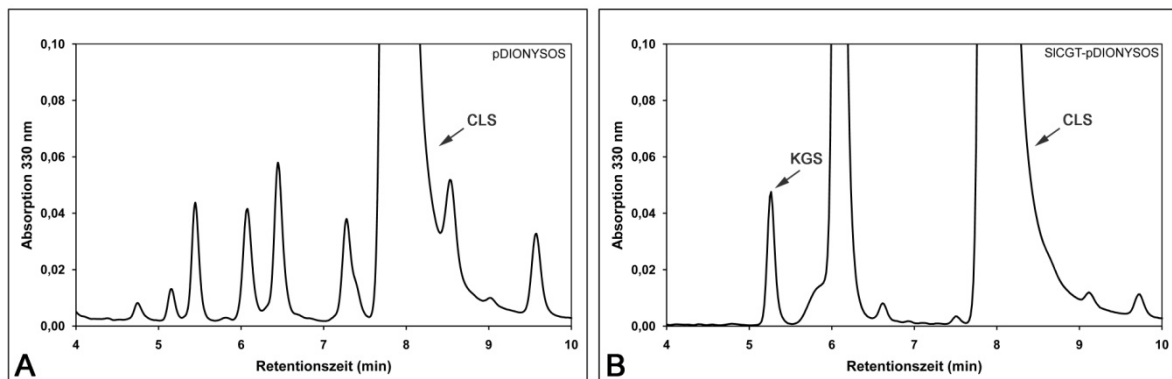


Abbildung 3.4: Heterologe Expression von *SICGT* im *S. cerevisiae*-System pDIONYSOS/INVSc1. Dargestellt werden repräsentative Auschnitte der HPLC-Diagramme für die Umsetzung von Chlorogensäure (CLS) zu Kaffeylglukarsäure (KGS) mit Protein-Rohextrakten aus mit pDIONYSOS (A) und mit SICGT-pDIONYSOS transformierten Hefezellen (B) nach 36stündiger Induktion. Es wurden 150 µg Protein eingesetzt.

Heterologe Expression in *N. benthamiana*

Die Wahl von *N. benthamiana* als pflanzliches Expressionssystem erhöht die Wahrscheinlichkeit einer korrekten posttranslationalen Modifikation des pflanzlichen *SICGT*-Enzyms. Eine einfache und schnell durchzuführende Methode liefert hier die transiente Expression des Proteins in den Blättern von *N. benthamiana* (Kapila et al. 1997). Die heterologe Expression von *SICGT* in Tabak erfolgte unter Kontrolle des starken lichtregulierten Promotors für das Gen der kleinen Rubisco-Untereinheit (*Rbcs1*) aus *Asteraceous chrysanthemum*, da für dieses System eine sehr hohe Expressionsrate in Pflanzen beschrieben wurde (Outchkourov et al. 2003).

Um zu testen, ob die *SICGT* in den Blättern von *N. benthamiana* funktionell exprimiert wird und ob ein C-terminaler 6 x His-tag einen Einfluss auf die Expressionsrate bzw. auf die Funktionalität des Proteins hat, wurden zwei verschiedene Expressionskonstrukte basierend auf dem binären Vektor pBINPLUS hergestellt (Abbildung 3.4).

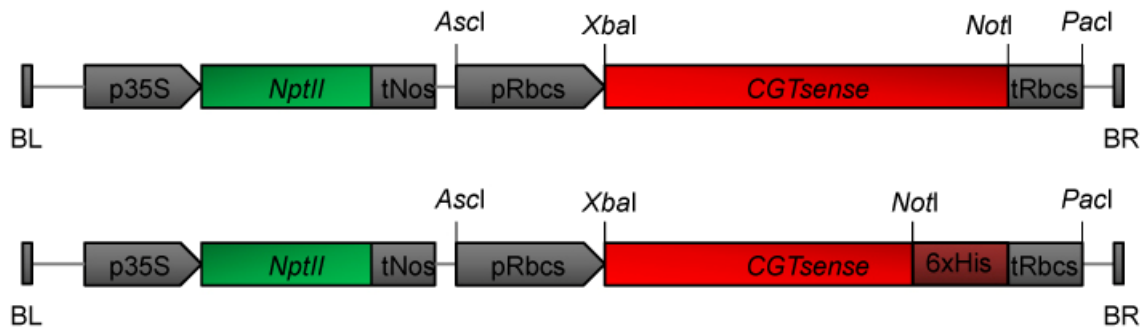


Abbildung 3.5: Überexpressionskonstrukte für die heterologe Expression der *SICGT* [pBIN-SICGT bzw. pBIN-SICGT(tag)]. BL und BR: Linke und rechte Bordersequenz, p35S: 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus, tNos: Terminator der Nopalinsynthetase, *NptII*: Neomycin-Phosphotransferase II (Kanamycin-Resistenz), pRbcs und tRbcs: Rbcs-Promotor bzw. -Terminator aus *A. chrysanthemum*, CGTsense: ORF der *SICGT*-cDNA

Die Infiltration der Tabakblätter mit dem *A. tumefaciens*-Stamm GV2260 erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Kapila et al. (1997). Nach fünftägiger Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus wurden Proteinextrakte aus den infizierten Blattbereichen hergestellt und für Aktivitätstests genutzt.

Im Enzymassay mit Proteinrohextrakten konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle Expression der *SICGT* in Blättern von *N. benthamiana* möglich ist (Abbildung 3.6).

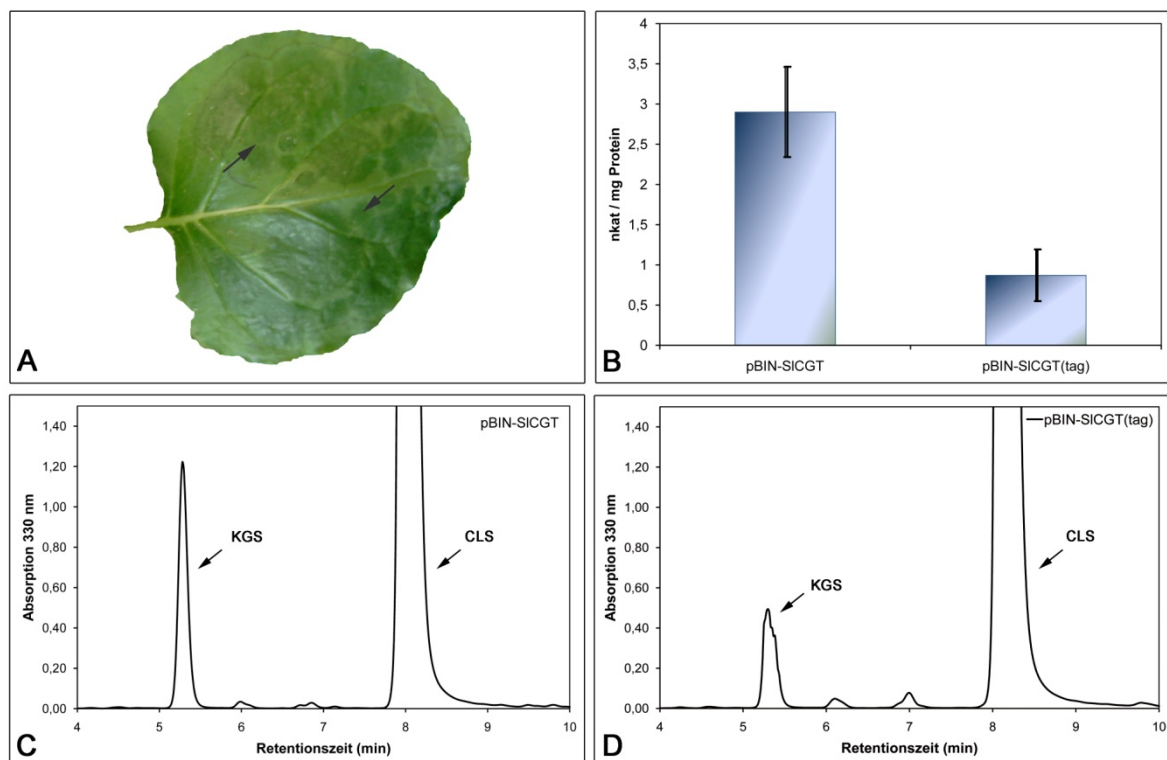


Abbildung 3.6: Heterologe Expression von *SICGT* in *N. benthamiana*. A: Infiltrierte Bereiche (Pfeile) eines Tabakblattes nach fünftägiger Inkubation bei 23°C und 16 h Licht. B: Vergleiche der

spezifischen katalytischen Aktivität des heterolog exprimierten *SICGT*-Gens mit [pBIN-SICGT(tag)] und ohne 6 x His-Tag (pBIN-SICGT) nach fünf Tagen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus je drei Messungen. C-D: Repräsentative Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme nach Umsetzung von Chlorogensäure (CLS) zu Kaffeylglukarsäure (KGS) mit pflanzlichen Rohextrakten von *SICGT* (C) und *SICGT*(tag) (D). Es wurden 150 µg Protein eingesetzt.

Die spezifische Aktivität des *SICGT*-Proteins ohne His-tag (pBIN-SICGT) betrug fünf Tage nach Infiltration im Durchschnitt 2,9 nkat mg⁻¹ Protein. Im Gegensatz dazu ergab die Expression der *SICGT* als His-Tag-Fusionsprotein [pBIN-SICGT(tag)] nach fünf Tagen nur eine durchschnittliche Aktivität von 0,87 nkat mg⁻¹, was eine Reduktion um etwa 70 % ergibt. Damit konnte gezeigt werden, dass ein C-terminaler 6 x His-tag die Aktivität des Proteins stark beeinträchtigt.

Durch die funktionelle Expression der *SICGT*-cDNA konnte eindeutig bewiesen werden, dass es sich bei der identifizierten cDNA um die für die CGT codierende cDNA handelt.

3.1.4 Genomische Struktur von *SICGT*

Analyse genomischer Fragmente

Mit Hilfe der Primer, die bereits zur Amplifikation und Klonierung der full length cDNA genutzt wurden (CGT_F, CGT_R), konnte durch PCR ein Fragment aus genomischer DNA von *S. lycopersicum* amplifiziert werden. Dieses Fragment hatte eine Größe von 1509 bp. Durch Sequenzvergleiche mit der *SICGT*-cDNA konnten 5 Exons und 4 Introns ermittelt werden (siehe Anhang, Abbildung A.1). Abbildung 3.13 zeigt schematisch die Organisation des *SICGT*-Genes.

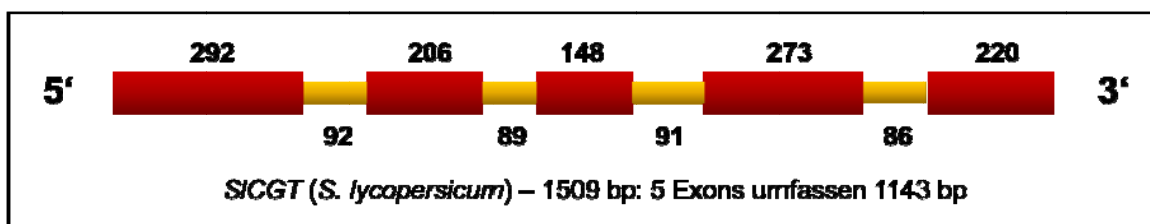


Abbildung 3.7: Exon-Intron-Struktur von *SICGT* aus *S. lycopersicum*. Die Größe der Exons (rot) und Introns (gelb) ist in Basenpaaren angegeben.

Genomische Southern Blot – Analyse

Durch Southern-Analysen sollte überprüft werden, ob es mehrere Kopien der *CGT* im Genom von *S. lycopersicum* gibt.

Für die Restriktion der genomischen DNA wurden zwei Enzyme ausgewählt. Für *EcoRI* trägt das *SICGT*-Gen keine Erkennungssequenz, während *NcoI* unikal in der Nähe des 5'-Terminus schneidet (454 bp nach dem Startcodon). Die Hybridisierung erfolgte mit der DIG-markierten *SICGT*-cDNA als Sonde. Nach Auswertung des Southern Blots wurde für den Verdau mit *EcoRI* ein Signal detektiert, während der Verdau mit *NcoI* zwei Banden zeigte (siehe Abbildung 3.14).

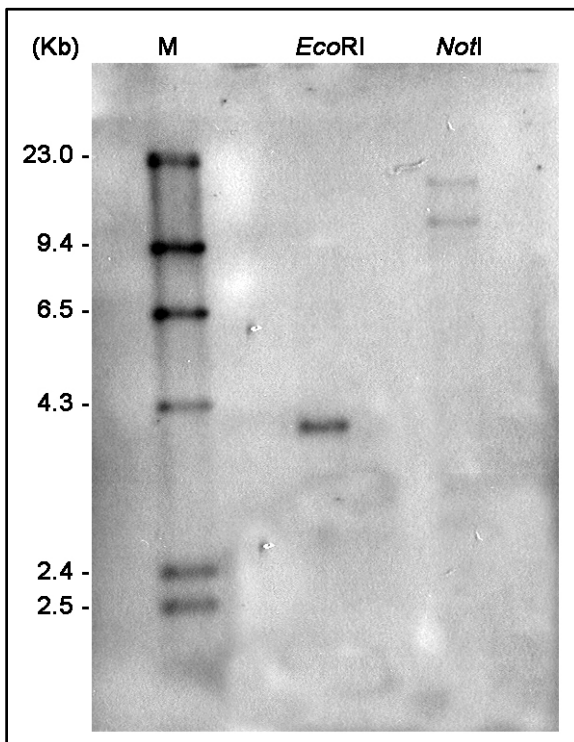


Abbildung 3.8: Genomische Southern-Analyse in *S. lycopersicum*. 5 µg genomische DNA aus Tomatenblättern wurden über Nacht mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* bzw. *NcoI* bei 37°C inkubiert, elektrophoretisch getrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Die Hybridisierung wurde mit der kompletten DIG-markierten *SICGT*-cDNA durchgeführt, die Exposition erfolgte für zwei Stunden bei 37°C.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es im Genom von Tomate nur eine Kopie des Genes für die *SICGT* gibt, das Gen ist also unikal.

3.2 Charakterisierung der SICGT

3.2.1 Die Proteinstruktur der SICGT

Um Aussagen über die Zugehörigkeit zu einer Enzymfamilie, Reaktionsmechanismen und das putative katalytische Zentrum treffen zu können, erfolgten zunächst computergestützte Analysen der ermittelten Proteinsequenz.

Das aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Protein umfasst 380 Aminosäuren (Abbildung 3.21) und zeigt in Datenbankanalysen Ähnlichkeiten zu Enzymen aus der Familie der GDSL-Lipasen. Innerhalb der Proteinsequenz konnten die vier von Dr. Nimtz nach der Reinigung des CGT-Proteins aus *S. lycopersicum* identifizierte Peptidfragmente wiedergefunden werden.

1	<u>MALGMRVVVLHLLLSILLIQLIKGDDDMVIKLEEPKLLKCGIDRIFQFG</u> <u>SL</u> <u>SDTGNC</u> LR
61	ESYCGAQTKTGKLPYGMNFYQ AT GRCSDGFTILDYIAMECGLPLINP <u>SLEENADFS</u> HG V
121	NFAVSGATALSAEYLISRDIAMSFTNS <u>SLSVQMRWMS</u> SYFKSVCSNDCAKYLENSLFLIG
181	EIGGD V TYGFKQ G KPIEEVRRIVPDI V KNIIHSVRTVIGFGATRILVPGNFP S GC F PII
241	LTLYM <u>ND</u> SSTVYDEYHCAEEWNNFTISYNNLLQOSIHELNEEY PN ISIIYGDY N AYY W L
301	LRNAVALGFN K TLQIS CCG IGGEY NY TES RR CGK P GAEK ACADP SSYLS W IG S HL T Q K A
361	YGWITKWLIDDILPQLNCRV

Abbildung 3.9: Sequenz des abgeleiteten SICGT-Proteins. Die N-terminale Signalsequenz ist doppelt unterstrichen. Die mögliche katalytische Triade der GDSL-Lipasen ist rot hinterlegt, das GDSL-Motiv ist eingerahmt. Blau hinterlegt ist das Aspartat 186, welches ebenfalls als Bestandteil der katalytische Triade postuliert wurde (Ruppert et al. 2005). Putative N-Glykosilierungsstellen sind unterstrichen. Die vier identifizierten Peptidfragmente sind durch blaue Rahmen gekennzeichnet.

Für das abgeleitete Protein ergab sich ein Molekulargewicht von 42,58 kDa, ein isoelektrischen Punkt von 5,2 und es konnten außerdem typische Merkmale für GDSL-Lipasen innerhalb der Proteinstruktur ermittelt werden. So enthält die Sequenz in konservierter Position die Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat, die in den GDSL-Lipasen die katalytische Triade bilden (Chang et al. 1996; Lo et al. 2003; Akoh et al. 2004; Ling et al. 2006). Weitere Analysen der N-terminalen Sequenz sagten eine putative

Signalsequenz voraus, die vermutlich posttranslational nach der Aminosäure 24 abgespalten wird (SignalP 3.0⁴) und die anscheinend dafür sorgt, dass das Enzym sekretiert wird (TargetP 1.1⁵). Durch vorangegangene Lokalisationsstudien konnte ein Transport in den Apoplasten bestätigt werden. Weiterhin konnten sieben putative N-Glykosilierungsstellen vorausgesagt werden (NetNGlyc 1.0⁶).

Abbildung 3.10 zeigt einen Sequenzvergleich mit den beiden GDSL-Lipasen aus dem Sekundärstoffwechsel, der Sinapinesterase aus *B. napus* und der Acetylajmalan-Esterase aus *R. serpentina*, sowie zwei weiteren Vertretern dieser Enzymfamilie aus dem Primärstoffwechsel, einer Carboxylesterhydrolase aus *A. thaliana* (Brick et al. 1995) und einem Lanatosid-15'-*O*-Acetylerase-ähnlichen Enzym aus *Oriza sativa* (Sasaki et al. 2002).

<i>S. lycopersicum</i>	<i>M</i> ALG--MRVVVHLI... <i>I</i> LLQLIK...DDDMVIKLE...PKLKKCGI--DR...FQ...GDSL... <i>I</i> ...RESYCGAQT...TKGL...PYGMN...YQNA...TGR	86
<i>B. napus</i>	<i>M</i> ASS--LKKLITSF...LFFFTNIVAS...-----S...PSCRR--Y--KS...IS...FGDS...IAD...TCNY...HLS...DVNHPP...QAFL...PYGET...FSVPT...TGR	76
<i>A. thaliana</i>	<i>M</i> ASS--LK-----K...I...S...FLLVLY--ST...IIVASS...SRCRR--F--KS...IS...FGDS...IAD...TCNY...HLS...DVNHLP...QSAFL...PYGES...FHPFS...TGR	77
<i>O. sativa</i>	<i>M</i> AFAGDARIVVVA...VAA...FV...VGVAVE...-----K...GEGGGGGV...GVCFER...FS...GDSL...T...TCNF...HLS...VPED...FDPARS...L...PYQT...FGRPS...TGR	84
<i>R. serpentina</i>	<i>M</i> --G--F-ARLLHLV...F...L...--VFA...ITNGLI...-----CPF--DS...YQL...GDS...S...TCNLI...RL...PPD...GPT...FTA...A...HF...YGET...FGPT...TGR	71
<i>S. lycopersicum</i>	CNDGFI...L...Y...DAME...C...L...L...N...S...I--E...E...AD...SH...GVNF...AV...SGATAL...SAEY...I...S...D...I...AM...S...T...NS...S...L...SV...MR...M...SS...Y...FK...SV...I...--N...--D...GA	169
<i>B. napus</i>	NEDGRL...I...D...F...I...E...F...L...E...L...Y...V...P...Y...F...G...S...Q...V...S...E...Q...V...N...F...A...V...G...A...T...D...R...A...F...F...I...E...K...G...I...V...S...D...F...T...N...V...S...L...S...V...Q...L...N...T...F...K...I...L...P...T...L...C...A...S...S...R...--D...C...R	163
<i>A. thaliana</i>	AENRRL...I...D...F...I...E...F...L...E...L...Y...V...P...Y...F...G...S...Q...V...S...E...Q...I...N...F...A...V...G...A...T...D...R...A...F...L...G...K...G...E...S...D...F...T...N...V...S...L...S...V...L...D...T...F...K...I...L...P...N...L...--A...S...T...R...D...K	164
<i>O. sativa</i>	YSDGRNLL...D...F...I...E...F...L...E...L...Y...V...P...Y...A--G...D...R...Q...A...N...F...A...V...G...A...T...A...N...G...S...F...F...R...D...G...V...E...P...T...W...P...H...L...D...E...Q...M...F...K...K...L...T...V...S...--S...--E...S	166
<i>R. serpentina</i>	CSDGRL...I...D...F...I...E...F...L...E...L...N...Y...Y...--Q...Q...V...S...R...H...V...N...F...A...V...A...G...A...T...A...L...D...R...S...F...A...A...G...V...Q...V...S...D...I...H...S...L...A...L...N...F...R...Y...L...G...S...I...--T...P...K...E...S	156
<i>S. lycopersicum</i>	--KY...E...N...S...I...F...L...I...G...E...I...G...D...V...T...G...F...K...Q...E...P...E...V...R...R...I...D...V...R...N...I...H...S...V...R...T...V...G...F...A...T...R...I...L...V...P...G...N...F...S...C...G...P...I...I...D...L...Y...M...N...D...S...T...V...I...E...Y...H	256
<i>B. napus</i>	--EM...G...D...S...H...I...M...E...I...G...N...D...Y...N...P...F...E...D...S...N...E...I...K...E...L...T...L...I...N...A...S...D...A...I...V...D...L...D...L...G...K...T...F...L...V...P...G...S...F...G...C...S...A...A...Y...T...I...F...Q...T...A...K...E...D...Y...D...P...L...T	250
<i>A. thaliana</i>	--EM...G...D...S...H...I...M...E...I...G...N...D...Y...N...P...F...E...D...S...N...E...I...K...E...L...T...L...I...N...A...S...S...A...I...V...D...L...D...L...G...K...T...F...L...V...P...G...S...F...T...C...S...A...A...Y...T...I...F...Q...T...V...A...K...D...Q...D...P...L...T	252
<i>O. sativa</i>	LNDIMTR...S...L...E...V...G...V...E...N...D...Y...N...H...L...I...V...R...S...L...D...L...H...E...L...V...K...V...G...T...T...S...A...I...T...E...L...N...L...A...K...K...L...V...P...G...N...F...I...S...V...P...L...Y...S...I...F...F...S...Q...K...E...D...Y...D...E...K...T	255
<i>R. serpentina</i>	--NK...K...N...A...L...I...L...N...I...G...N...D...Y...N...A...--P...N...R...T...E...E...I...R...A...Y...E...F...T...E...A...V...A...N...A...T...R...E...I...R...L...G...S...R...V...I...P...G...I...F...I...S...V...A...R...N...I...N...F...F...D...G...K...D...L...G	242
<i>S. lycopersicum</i>	A...E...E...--N...N...T...I...S...Y...N...L...Q...S...I...H...E...N...E...E...P...N...I...S...I...G...D...Y...N...A...Y...W...L...R...N...A...V...A...L...L...N...K...K...T...Q...I...--S...C...G...I...G...E...N...Y...E...S...R...R...G...P...A...E...K...A...D	344
<i>B. napus</i>	G...C...L...P...L...D...G...K...H...H...D...E...Q...K...T...E...I...K...R...R...K...R...Y...P...H...V...N...I...Y...A...D...Y...N...S...L...R...Y...Q...E...P...T...K...Y...E...K...N...R...P...--A...--A...C...C...G...V...G...Q...N...F...I...G...E...D...Y...E...V...--G...Y...Q...N	337
<i>A. thaliana</i>	Y...P...L...L...--E...G...E...H...H...E...Q...K...T...E...L...K...R...Q...K...F...Y...E...H...V...N...I...Y...A...D...H...N...S...L...R...F...Y...Q...E...P...A...K...Y...E...K...N...K...P...--A...--A...C...C...G...V...G...K...N...F...I...G...E...D...Y...E...V...--N...Y...Q...N	338
<i>O. sativa</i>	G...C...I...K...L...E...E...T...E...Y...H...R...L...G...E...E...L...E...K...R...N...L...Y...D...V...S...I...Y...A...D...Y...G...A...L...N...I...F...L...A...P...L...Q...F...G...E...--T...V...P...L...N...S...C...C...G...S...D...A...P...N...C...S...P...I...L...G...H...P...S...--V...V...S...D	341
<i>R. serpentina</i>	L...S...S...L...--N...L...S...I...Y...F...N...S...I...F...R...A...L...A...S...I...E...F...Q...A...V...I...Y...A...D...Y...N...W...R...F...F...R...N...G...P...A...L...S...N...S...T...S...L...K...--C...C...G...I...G...E...P...N...Y...D...P...R...E...G...S...R...V...--P...V...E...N	329
<i>S. lycopersicum</i>	P...S...L...S...L...D...S...H...L...T...Q...K...R...G...W...I...T...K...W...L...-----D...D...--L...L...Q...L...N...C...R...V...-----	380
<i>B. napus</i>	P...S...E...I...N...D...G...Y...H...L...T...E...A...H...Q...M...A...H...G...I...-----L...N...G...Y...A...A...F...N...W...S...C...L...D...A...S...V...D...N...E...S...S...F...G...S...-----	389
<i>A. thaliana</i>	P...S...E...I...N...D...G...Y...H...L...T...E...A...H...Q...M...T...E...G...I...-----L...N...G...Y...A...T...A...F...D...W...S...C...L...G...S...G...T...V...D...T...-----	384
<i>O. sativa</i>	P...S...K...I...T...S...N...D...G...L...F...T...E...A...T...K...I...I...Q...G...Q...S...A...V...D...H...P...A...M...F...S...S...E...--K...G...E...P...V...F...-----	386
<i>R. serpentina</i>	T...Q...I...Q...N...D...G...T...F...T...Q...A...H...R...R...V...A...E...Y...V...-----P...G...--I...K...A...L...K...C...S...Y...S...N...I...Q...F...L...R...E...G...E...G...R...Q...A...L...R...N...E...R...E	387

Abbildung 3.10: Sequenzvergleich des abgeleiteten SICGT-Proteins aus *S. lycopersicum* mit der Sinapinesterase aus *B. napus*, der Carboxylesterhydrolase aus *A. thaliana*, dem Lanatosid-15'-*O*-Acetylerase-ähnlichen Enzym aus *O. sativa* und der Acetylajmalan-Esterase aus *R. serpentina*. Die putativen Signalpeptide sind kursiv dargestellt, identische Aminosäuren blau hinterlegt. Die vier konservierten Blöcke der SGNH-Hydrolasen sind eingerahmt, die Aminosäuren der putativen katalytischen Triade mit roten Pfeilspitzen gekennzeichnet.

⁴ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

⁵ <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

⁶ <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

3.2.2 Das katalytische Zentrum der *S*ICGT

Sequenzanalysen der GDSL-Lipasen zeigen, dass die Aminosäuren der katalytischen Triade in Sequenz-Blöcken liegen, die hoch konserviert sind. Vergleiche der CGT-Sequenz mit bekannten GDSL-Lipasen legten die Vermutung nahe, dass die *S*ICGT zur Katalyse des Acyltransfers ein *charge relay*-System aus Serin27, Histidin331 und Aspartat162 oder Aspartat328 des reifen Proteins verwendet.

Um den Einfluss eines katalytischen Serylrestes zu bestätigen, wurde das gereinigte Enzym einer PMSF-Behandlung unterzogen. PMSF ist ein Inhibitor, der die Serylreste von Proteinen phosphoryliert und dadurch die Aktivität vermindert. Dies konnte bereits für andere GDSL-Lipasen erfolgreich gezeigt werden (Cummins und Edwards 2004). Die Behandlung der CGT mit 1, 10 und 50 mM führten zu einer starken Reduktion der Enzymaktivität um ca. 60 % bei einer PMSF-Konzentration von 10 mM bis hin zum völligen Verlust der Aktivität bei Zugabe von 50 mM PMSF (Abbildung 3.11). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Ser51 Teil der katalytischen Triade ist.

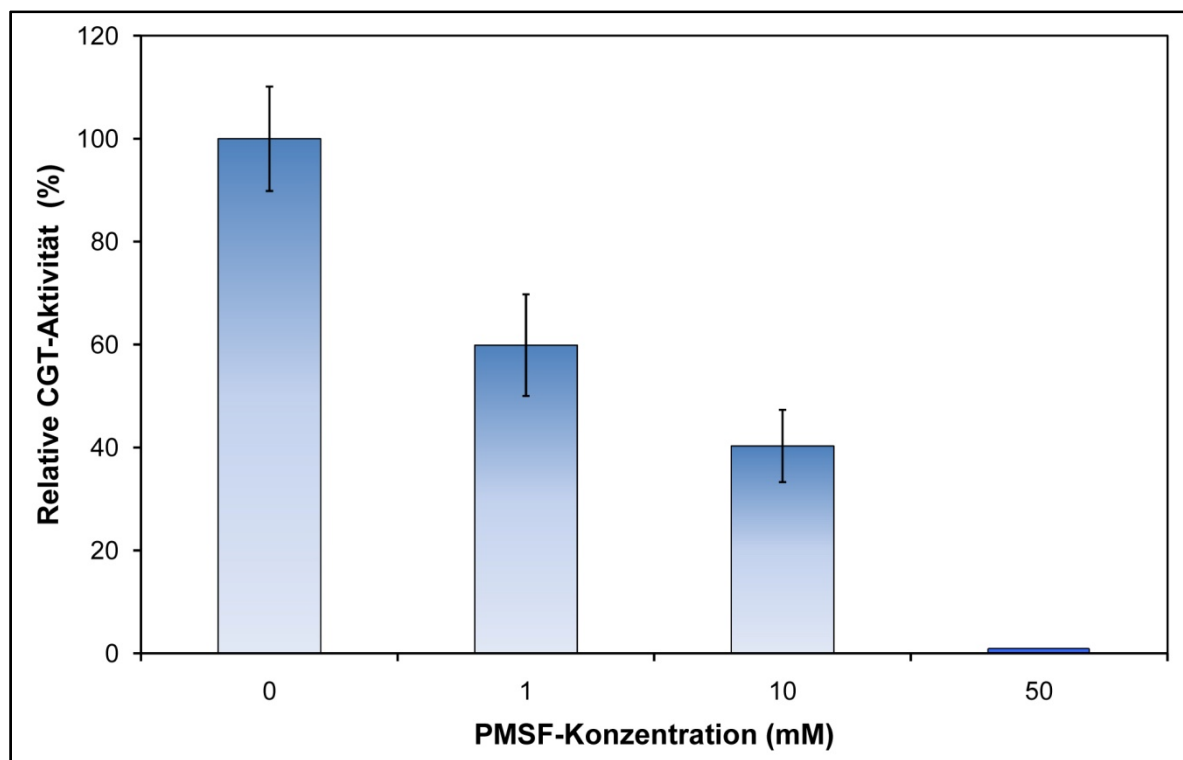


Abbildung 3.11: Hemmversuche der CGT-Aktivität mit PMSF. 0, 1, 10 und 50 mM PMSF wurden zum CGT-Assay gegeben und die CGT-Aktivität mittels HPLC-Analysen bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Durch Mutagenesestudien sollte nun der Einfluss der einzelnen Aminosäuren der putativen katalytischen Triade auf die Enzymaktivität bestimmt werden. Gegen Alanin ausgetauscht wurden vier Aminosäuren: Ser27, His331 und aufgrund unterschiedlicher Literaturangaben sowohl Asp162 als auch Asp328. Die cDNA-Sequenzen wurden anschließend mit dem 35S-Promotor fusioniert und nach Insertion in den Vektor pLH7000 transient in *N. benthamiana* exprimiert. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde ein 35S-GUS-Fusionskonstrukt im Vektor pLH7000 coinfiltriert. Nach fünftägiger Inkubation im Gewächshaus wurde der Proteinrohextrakt aus infiltrierten Blättern zum einen für CGT-Aktivitätsassays und anschließende HPLC-Analysen genutzt, zum anderen wurden GUS-Aktivitätsmessungen durchgeführt, um die Expression der einzelnen Konstrukte vergleichen zu können. Die GUS-Expression in mit dem Wildtypgen transformierten Pflanzen wurde mit Eins gleichgesetzt, für die anderen Konstrukte wurde entsprechend der Expression ein Faktor ermittelt und mit den ermittelten Enzymaktivitäten multipliziert. Abbildung 3.12 zeigt die ermittelten relativen Aktivitäten der verschiedenen *SICGT*-Varianten im Vergleich zur Wildtyp-Variante, die auf 100 % gesetzt wurde.

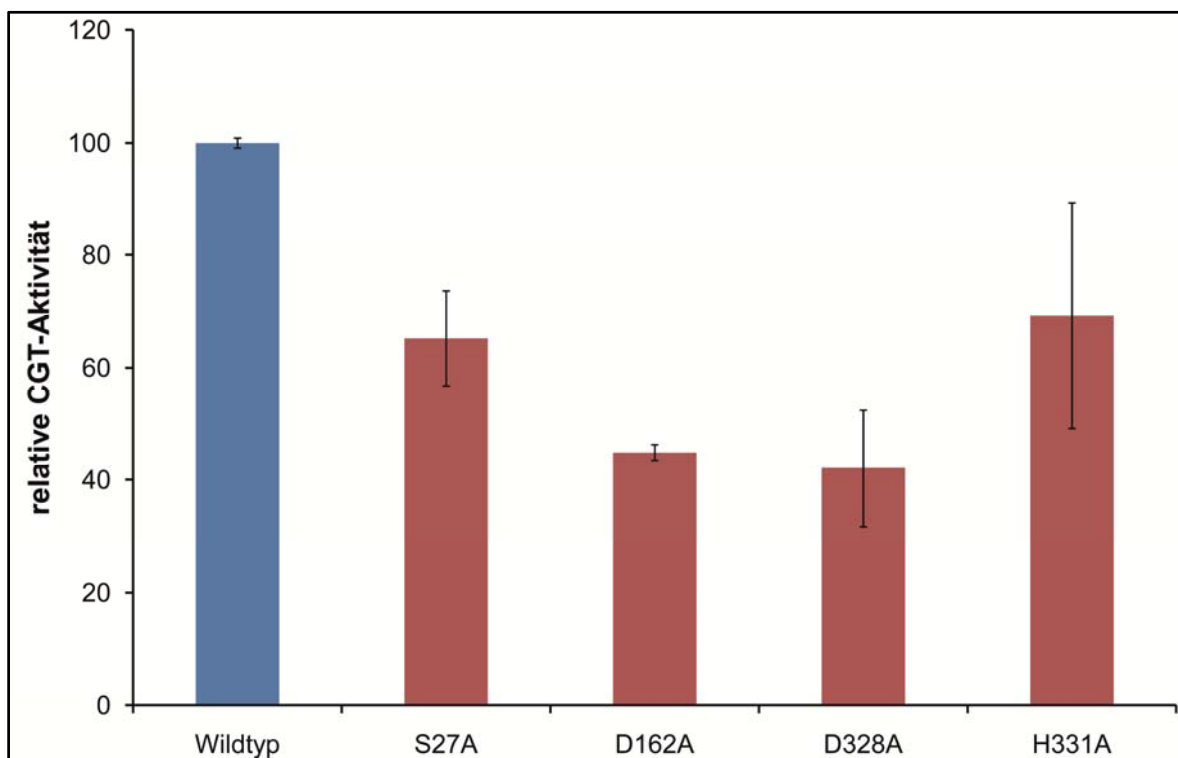


Abbildung 3.12: Mutagenese-Studien der *SICGT*. Vergleiche der spezifischen katalytischen Aktivität des heterolog exprimierten *SICGT*-Gens und der Sequenzvariationen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei biologischen Wiederholungen.

Überraschenderweise zeigte sich keine signifikante Veränderung der CGT-Aktivität in den einzelnen Enzym-Varianten, was bedeutet, dass die ursprüngliche katalytische Triade nicht mehr für die Enzymreaktion genutzt wird.

3.2.3 Hydrolytische Aktivität der SICGT

GDSL-Esterasen und –Lipasen wurden in der Literatur als hydrolytisch aktive Enzyme mit breit gefächertem Substratspektrum und breiter Regiospezifität beschrieben (Akoh, Lee et al. 2004). Dies führte zu der Annahme, dass die SICGT neben ihrer Transferaseaktivität auch eine Hydrolaseaktivität besitzt. Untersuchungen der *BnSCE* aus *B. napus* hinsichtlich der Hydrolyseaktivität zeigten, dass diese Esterase neben der Transferaseaktivität auch in der Lage ist, Phosphatidylcholin zu hydrolysieren. Neutralfette wurden allerdings nicht umgesetzt (Clauß et al. 2008).

Um die Hydrolyseaktivität der SICGT zu testen, wurde ein colorimetrischer Assay gewählt, in dem ein farbloses Substrat durch Hydrolyse zu einem gelben Produkt umgesetzt wird. Die Intensität der Farbreaktion lässt sich mit einem Photometer messen und anhand einer Eichgerade quantifizieren (Ruiz et al. 2004).

Für den Assay wurde das gereinigte CGT-Protein genutzt, als Kontrolle diente eine kommerziell verfügbare Lipase aus *Candida rugosa*. Fünf verschiedene Proteinkonzentrationen der Enzyme wurden für 15 min mit dem Substrat *p*-Nitrophenyllaurat inkubiert und der Umsatz zu *p*-Nitrophenol bei einer Absorption von 405 nm bestimmt.

Wie aus Abbildung 3.13 A ersichtlich, ist die Lipase aus *C. rugosa* (CrLIP) hoch aktiv. Die SICGT ist nicht in der Lage, das farblose Substrat zu spalten, hier ist kein Farbumschlag zu erkennen (B) und auch keine Substratumsetzung messbar. Die CGT ist also zumindest für dieses Substrat nicht mehr in der Lage, es hydrolytisch zu spalten.

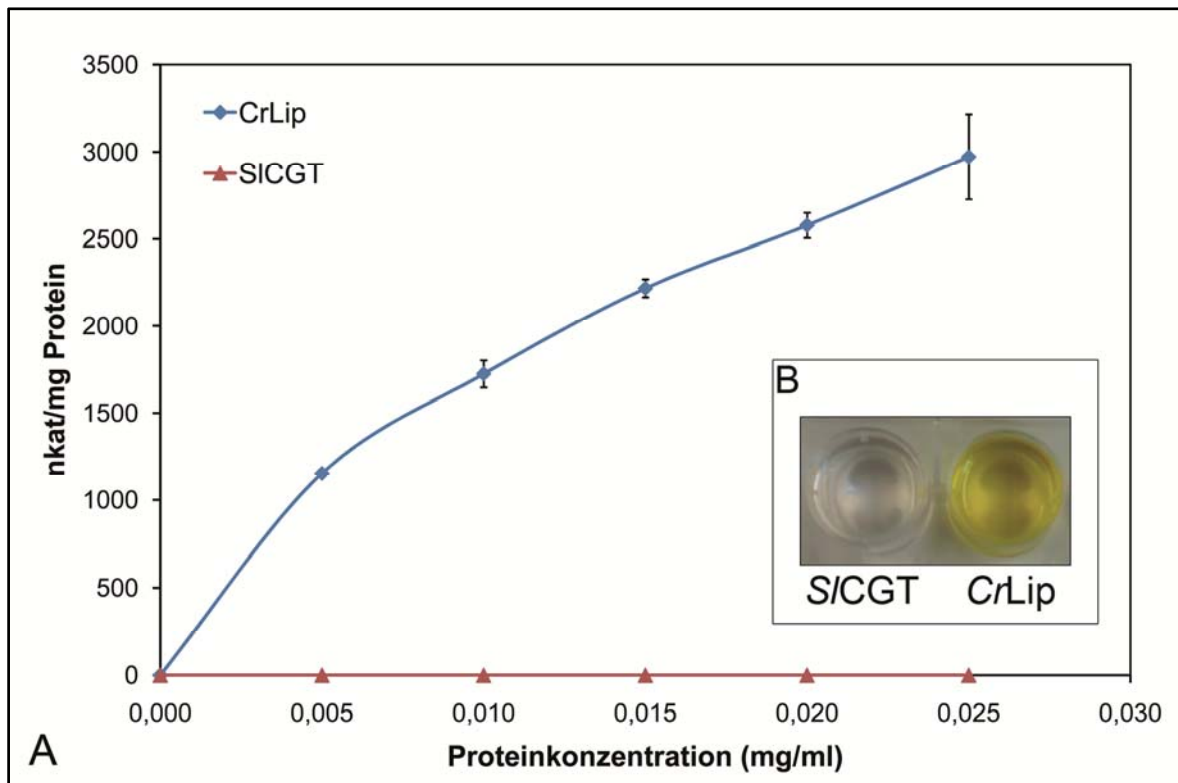


Abbildung 3.13: Colorimetrischer Assay zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivität. A: Spezifische Aktivität der getesteten Enzyme im Lipase-Assay; B: Farbreaktion bei der Umsetzung des Substrates *p*-Nitrophenyllaurat zu *p*-Nitrophenol. Es wurden 0,025 mg/ml Protein eingesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

3.3 Biologische Bedeutung der SICGT

Nach erfolgreicher Identifizierung der *SICGT*-cDNA sollten im weiteren Verlauf der Arbeit Untersuchungen zur Genexpression, Enzymaktivität und Akkumulation der Metaboliten im Wildtyp von *S. lycopersicum* erfolgen, um ein Bild über die zeitliche und organspezifische Aktivität der SICGT zu erhalten. Des Weiteren sollte durch Genome Walking der putative Promotor des *SICGT*-Genes identifiziert und näher analysiert werden.

3.3.1 Regulation der Expression

Amplifizierung von Promotor-Bereichen durch Genome Walking

Promotoren sind genomische Sequenzbereiche, an denen die Transkription eines Gens initiiert wird und die oftmals regulatorische Sequenzmotive enthalten. Durch komplexe

molekulare Wechselwirkungen dieser sogenannten *cis*-aktiven Elemente mit *trans*-aktiven Faktoren wird bestimmt, wann und wie häufig die nachfolgende Nukleotidsequenz abgelesen wird.

Durch *Genome Walking* ist es möglich, unbekannte genomische DNA-Sequenzen ausgehend von einer bekannten Nukleotidsequenz zu isolieren. Dazu wird genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, die glatte Enden generieren. An die 5'-Enden der Fragmente wird dann ein DNA-Adapter mit bekannter Sequenz ligiert, so dass der Bereich zwischen diesem Adapter und einer bereits bekannten Sequenz des Zielgenes mittels PCR amplifiziert werden kann.

Für die Klonierung des 5'-Bereiches der *SICGT* wurde eine PCR mit einem genspezifischen Primer (GenWalk1) und einem Primer für den GenomeWalker Adapter (AP1), gefolgt von einer *nested* PCR mit dem genspezifischen Primer GenWalk 2 und dem Primer AP2, durchgeführt. Ausgehend von *PvuII* geschnittener DNA gelang die Amplifizierung einer 905 bp langen Sequenz aus der genomischen Region des *SICGT*-Genes in 5'-Richtung des Startcodons. Diese Sequenz sollte zumindest einen Teil des *SICGT*-Promotors enthalten.

Durch Analysen der putativen Promotorsequenz mit der Datenbank PLACE konnten 74 potentielle *cis*-aktive Elemente ermittelt werden. Eine detaillierte Aufschlüsselung dieser Daten befindet sich im Anhang (Tabelle A.2). Abbildung 3.14 zeigt die abgeleitete putative *SICGT*-Promotorsequenz mit *cis*-aktiven Elementen, die im Folgenden näher erläutert werden sollen. Allerdings handelt es sich bei den ermittelten Elementen um *in silico* Daten, deren tatsächliche Funktionen zum Beispiel durch Promotordeletionsstudien aufgeklärt werden müssten.

Besonders interessant innerhalb der ermittelten Daten sind natürlich die Elemente, die bereits in Promotoren von *S. lycopersicum* entdeckt wurden. Allerdings konnten auch Elemente identifiziert werden, die häufig in Promotoren regulierter eukaryotischer Gene vorkommen, wie zum Beispiel TATA-Boxen (magenta) und CAAT-Boxen (rot) (Lifton et al. 1978; Shirsat et al. 1989). Auch einige *cis*-aktive Sequenzmotive, welche in Promotoren lichtregulierter Gene von Mono- als auch Dikotyledonen vorkommen, z.B. die sogenannte I-Box (dunkelgrau), wurden ermittelt (Terzaghi und Cashmore 1995).


```

GAAGAAA GCGAAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGC
POLLEN1LeLAT52
GCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCCGCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAG
CTGGCGAAAAGGGGATGTGCTGCAAGGC GATTAAAGTTGGTAACGCCAGGTTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGT
CIRCADIANLeLHC
GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTACT
GCC-Core
ATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCCGGGCTGGTATAAAAAATTTGTCTAGTGAATTAAGTGTAAACAAAATTCACATTAATAT
CAGAAAAGAAA TTATCTTTTAATGTGTACAAACTTGATTCAAAATGAATAATATAGATAAAATAATTTAATAATCTGGTTAC CAATA
POLLEN1LeLAT52 I-BOX CAAT-Box
TTATTTTCATTGGTACATACATACTTCTTTGTATCCATCTTTACTTGGTCTACTTTTATAAAAATAACTGTT CAATAATATTTATTTAA
TATA-Box5 CAAT-Box TATA-Box5
TTTGAAAAT CAATACATCTTTGAAGTATTAATTTCTTATATTCAAAGGTAGTTTCAATAATTACTTTATAATAAATTATTATT
CAAT-Box CAAT-Box
GTTAAATGGATAGAATAATTTTGTGGCTTATATTTTATTTTGTGTTGAATGTGATATCTAGCTGTAAAAGACAA CAATGGTATT
TATA-Box5 TATA-Box5 CAAT-Box TATA-
AATTCGCTTATATTTCATTGCTTATGCGTATACGTCCTGTTTTTCATCCTATGGAAATTAATTGCGTTTTCTCCTTTCTATATAATCT
Box3 TATA-Box4
CAATTTTGTATTGCAAAATCAAATCAGTTCACCT ATG
CAAT-Box Translationsstart

```

Abbildung 3.14: Putative *SICGT*-Promotorsequenz. Der Translationsstart ist unterstrichen, die ermittelten *cis*-aktiven Elemente sind farbig hinterlegt.

Zu den in Tomate identifizierten regulatorischen Sequenzmotiven gehört u.a. das GAAA-Motiv (grün) des Pollen*LeLat52*-Elementes, welches wahrscheinlich einen Transkriptionsfaktor bindet, um die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren zu stabilisieren. Dieses Motiv wurde erstmals für den Promotor des Tomatengens *Lat52* beschrieben, welches während der Pollenreifung transkribiert wird (Bate und Twell 1998).

Das Element CIRCADIANLeLHC (gelb) ist anscheinend im 5'-Bereich von lichtabhängigen *Lhc*-Genen der Tomate konserviert und scheint eine Rolle in der circadianen Aktivierung dieser Gene zu spielen (Piechulla et al. 1998).

Ein drittes interessantes Element in diesem Promotor ist die GCC-Box (hellgrau), welche in den Promotoren vieler *pathogenesis related* (PR) -Gene vorhanden ist. In Tomate bindet die GCC-Box den Transkriptionsfaktor Pti4, einen Ethylen-responsiven Faktor, welcher damit die Expression der Abwehrgene aktiviert (Chakravarthy et al. 2003).

Durch Fusion mit Reporter genen, deren Expression leicht zu quantifizieren ist, kann die Promotoraktivität eines bestimmten Gens in der intakten Pflanze untersucht werden. Als Reporter gen wird zum Beispiel das in Pflanzen nicht enthaltene, für die β -Glucuronidase (GUS) codierende *uidA*-Gen aus *E. coli* verwendet. Die β -Glucuronidase katalysiert die hydrolytische Spaltung eines großen Spektrums von β -Glucuroniden und β -Galakturoniden und die enzymatische Aktivität lässt sich im Gewebe der Pflanze histochemisch mittels einer Farbreaktion nachweisen (Blaufärbung). Die gesamte ermittelte Gensequenz des *SICGT*-Promotors wurde daher mit dem *uidA*-Gen fusioniert und transient in Tabak exprimiert. Als Kontrolle diente eine Fusion aus dem 35S-Promotor des

Blumenkohlmosaikvirus und dem *uidA*-Gen. Für dieses Kontrollkonstrukt ließ sich eine deutliche Blaufärbung in den Zellen der unteren Epidermis nachweisen, während für das *SICGT*-Promotorkonstrukt keine Färbung nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das lässt darauf schließen, dass der Promotor entweder eine zu geringe Aktivität besitzt oder dass eine Fragmentlänge von 900 bp nicht ausreicht, um Aktivität des Promotors zu induzieren oder dass für die Expression des Konstruktes das falsche Gewebe genutzt wurde. Das heißt, dass für die Induzierung der Promotoraktivität z. B. Transkriptionsfaktoren benötigt werden könnten, die im Tabakblatt möglicherweise nicht vorhanden sind.

Analyse der Genexpression, Enzymaktivität und Metabolitengehalte

In früheren Untersuchungen zur *SICGT* konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Enzyms in sich entwickelten Keimlingen recht schnell ansteigt. Auch in den nachfolgenden Laubblättern zeigt das Enzym eine hohe Aktivität (Strack und Gross 1990). Allerdings wurde die Transkriptakkumulation in bisherigen Untersuchungen nicht analysiert, da das Gen nicht bekannt war. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression der *SICGT* in Kotyledonen, Primärblättern und verschiedenen Organen der Tomate untersucht werden.

Zunächst wurden die Kotyledonen sich entwickelnder Keimlinge mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR einer Transkriptionsanalyse unterzogen.

Abbildung 3.15 zeigt, dass die Expression der *SICGT* in den Kotyledonen im Laufe der Keimlingsentwicklung zunächst ansteigt, 16 Tage nach Keimung stark zurückgeht und dann bis zum Absterben des Keimblattes auf einem niedrigen Niveau bleibt. Detektierbar ist das Transkript also in allen Entwicklungsstufen der Kotyledonen. Allerdings ist der Rückgang des *SICGT*-Transkriptes möglicherweise auch auf den physiologischen Zustand der Kotyledonen zurückzuführen.

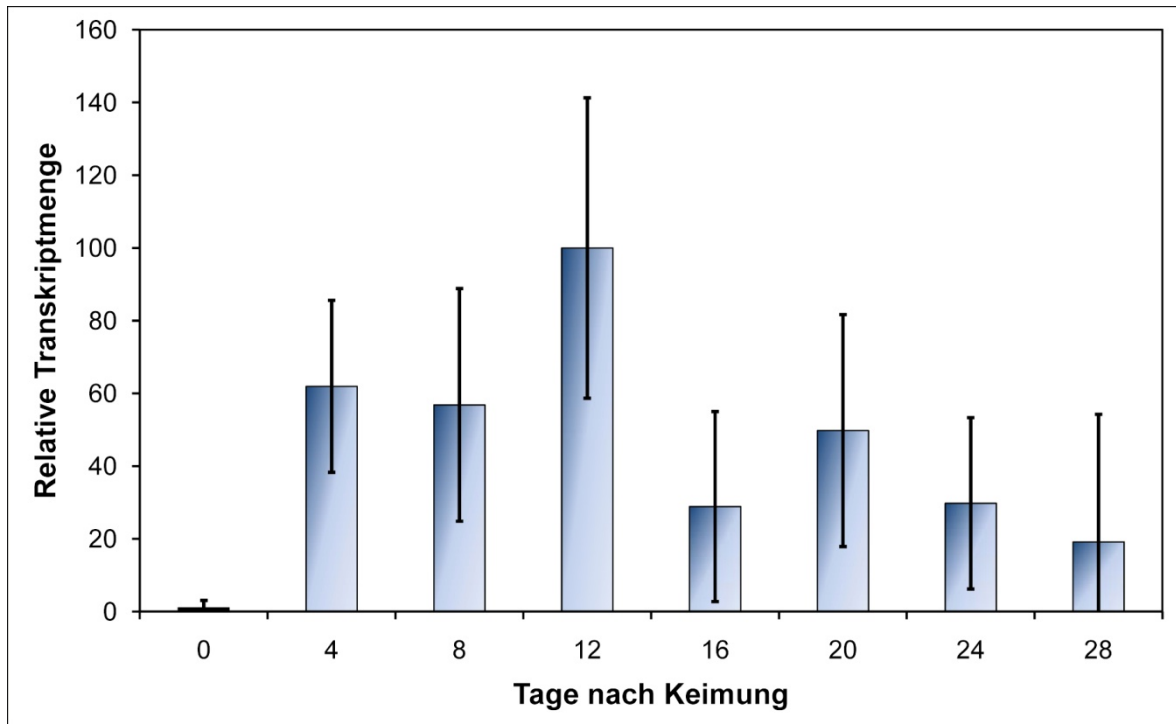


Abbildung 3.15: Relative Transkriptmenge der *SICGT* in Kotyledonen von *S. lycopersicum*. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Als konstitutives Gen wurde der Elongationsfaktor *EF1α* verwendet.

Im Vergleich dazu wurde auch in Primärblättern eine Analyse der Transkription mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die Primärblätter von 12 Tage alten bis hin zu 34 Tage alten Keimlingen untersucht. Wie in Abbildung 3.16 zu sehen wird die *SICGT* im Primärblatt von 12 und 14 Tage alten Pflanzen relativ stark exprimiert, in älteren Primärblättern geht die Transkriptmenge zurück, bis sie schließlich in 34 Tage alten Primärblättern nicht mehr detektierbar ist.

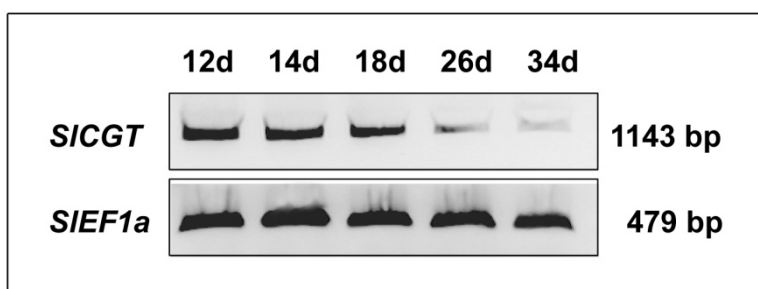


Abbildung 3.16: RT-PCR-Analyse der Abundanz des *SICGT*-Transkripts im Verlauf der Primärblattentwicklung. 1,5 µg RNA aus Blättern wurde in cDNA umgeschrieben, es wurden Primer für die *SICGT* und den Elongationsfaktor *EF1α* genutzt und eine PCR mit 25 Zyklen durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Aktivität der CGT in Keimlingen und Primärblättern wurden zunächst analog zu den Literaturangaben wiederholt. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Aktivität in Kotyledonen während der Keimlingsentwicklung stark ansteigt. Da die

Untersuchungen im Gegensatz zu den Analysen von Strack und Gross (1990) über Tag 16 der Entwicklung hinausgingen, konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der CGT ab Tag 16 auf ein niedriges Niveau abfällt und bis zum Absterben der Kotyledonen auf diesem Niveau bleibt (Abbildung 3.17 A). Die ermittelten Enzymaktivitäten folgen den Transkript-Abundanzen im Wesentlichen, auch wenn hier eine zeitliche Verschiebung zwischen dem Ansteigen der Genexpression und der CGT-Aktivität zu beobachten ist.

Die Aktivität in den Primärblättern ist bereits in den jungen Stadien sehr hoch und fällt dann ebenfalls auf ein stabiles Niveau ab (Abbildung 3.17 B). Auch hier stimmt die Aktivität weitestgehend mit den Ergebnissen der Transkriptanalysen überein. Allerdings ist auch in seneszenten Primärblättern noch CGT-Aktivität messbar, obwohl hier keine Genexpression mehr ermittelbar war. Das deutet auf eine hohe Stabilität des Enzymes hin.

Um zu untersuchen, welche Bedeutung die CGT-Regulation für die Metabolitkonzentration hat, sollten die in Methanol löslichen Metaboliten ebenfalls quantifiziert werden. Da aus den Analysen hervorging, dass die untersuchten Metabolite gut in Methanol löslich waren, wurde auf eine Untersuchung der unlöslichen methanolischen Rückstände verzichtet.

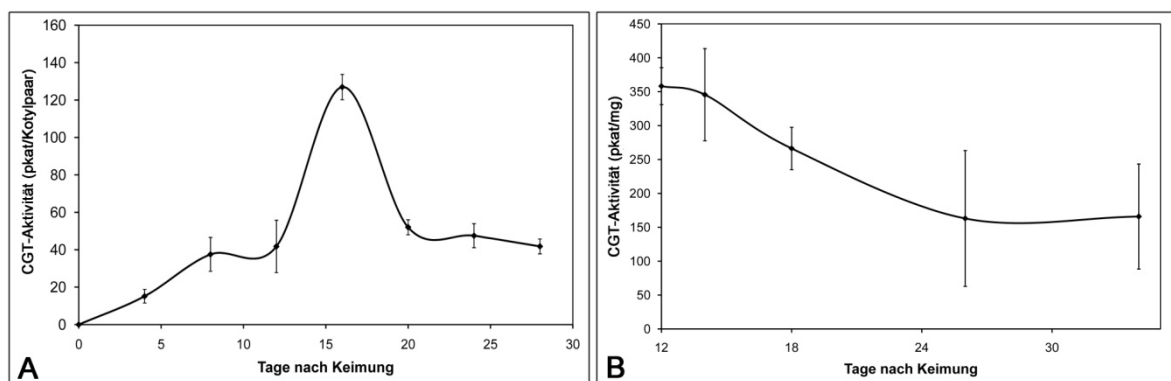


Abbildung 3.17: CGT-Aktivität in Rohextrakten aus Kotyledonen (A) und Primärblättern (B). Quantifiziert wurde die Bildung von Kaffeoylglukarat aus Chlorogensäure. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Proben.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Chlorogensäure in vielen Organen der Tomate akkumuliert. Es wurde jedoch gezeigt, dass in Kotyledonen und im Primärblatt der Gehalt an Kaffeoylglukarsäure überwiegt.

In den Keimblättern steigt die Konzentration dieses Metabolites über den gesamten Zeitraum der Keimlingsentwicklung an (Abb. 3.18 A), während der Gehalt an

Chlorogensäure auf einem recht niedrigen Niveau bleibt. In den Primärblättern steigt die Konzentration beider Metabolite im Laufe der Entwicklung an, allerdings überwiegt auch hier der Gehalt an Kaffeoylglukarsäure (Abb. 3.18 B).

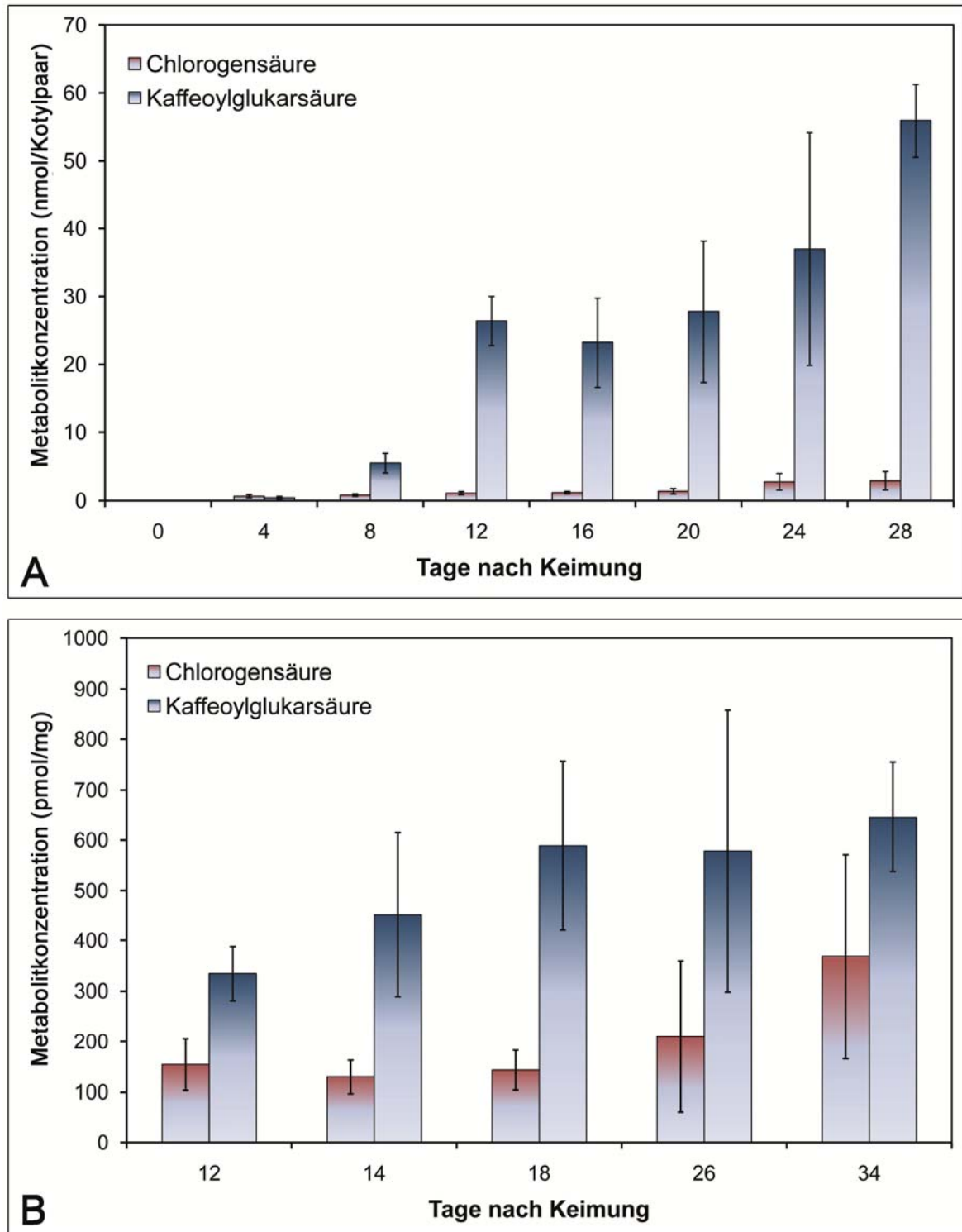


Abbildung 3.18: Gehalte an löslichen HCA-Metaboliten in *S. lycopersicum*. A zeigt den Gehalt von Chlorogensäure und Kaffeoylglukarsäure in Kotyledonen sich entwickelnder Keimlinge, B den Gehalt dieser Metaboliten in Primärblättern. Die Gehalte beider Metabolite wurden mittels HPLC

bestimmt. Für jeden Datenpunkt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Messungen dargestellt.

Im Anschluss an die Analysen der Kotyledonen und Primärblätter sollte geklärt werden, ob die *SICGT* nur in Blättern oder auch in anderen Organen der Tomate exprimiert wird. Dazu wurde RNA aus ausgewählten Organen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert (Abbildung 3.19).

In Samen und reifen Früchten konnte keine Expression der *SICGT* nachgewiesen werden. Eine sehr geringe Transkriptmenge war in der Wurzel, im Spross, in adulten Blättern und grünen Früchten detektierbar, während das Expressionslevel in jungen Blättern und Blüten sehr hoch war. Analysen der Enzymaktivität und der löslichen HCA-Konjugate sollten nun Aufschluss darüber geben, ob die Expression in den einzelnen Organen mit der Aktivität der *SICGT* korreliert.

Während die Expression in jungen Blättern und Blüten sehr hoch war, konnte in Wurzeln, Spross, adulten Blättern und grünen Früchten nur eine sehr geringe Transkriptmenge detektiert werden. In Samen und reifen Früchten konnte wie aus der Abbildung ersichtlich keine Expression der *SICGT* nachgewiesen werden.

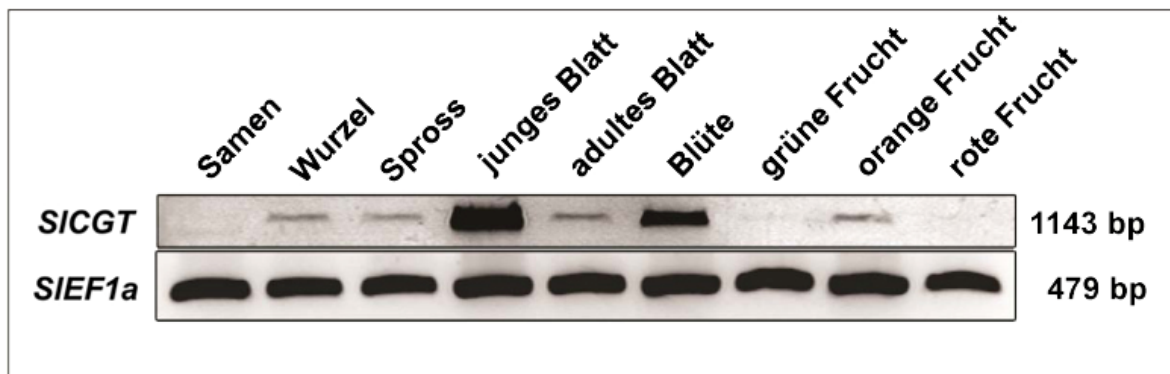


Abbildung 3.19: RT-PCR-Analyse der Abundanz des *SICGT*-Transkripts in verschiedenen Geweben von *S. lycopersicum*. 1,5 µg RNA aus unterschiedlichen Geweben wurde in cDNA umgeschrieben, es wurden Primer für die *SICGT* und den Elongationsfaktor *EF1α* in einer PCR mit 25 Zyklen genutzt.

Untersucht wurde des Weiteren die CGT-Aktivität in verschiedenen Organen der Tomate (Abbildung 3.20). Für Samen, Wurzel, Spross und Früchte stimmte das Bild mit der CGT-Expression überein, hier war die Aktivität sehr gering. Ein überraschendes Bild ergab sich allerdings für die Analysen der Blätter und Blüten. In jungen Blättern und in Blüten war die CGT-Aktivität trotz starker Genexpression verhältnismäßig gering, während in adulten

Blättern trotz geringer Transkriptmenge eine sehr hohe CGT-Aktivität gemessen werden konnte. Das lässt entweder eine posttranslationale Regulation der CGT-Aktivität vermuten, das Enzym bleibt über einen langen Zeitraum stabil oder es akkumuliert über einen bestimmten Zeitraum und ist dadurch im alten Blatt sehr abundant.

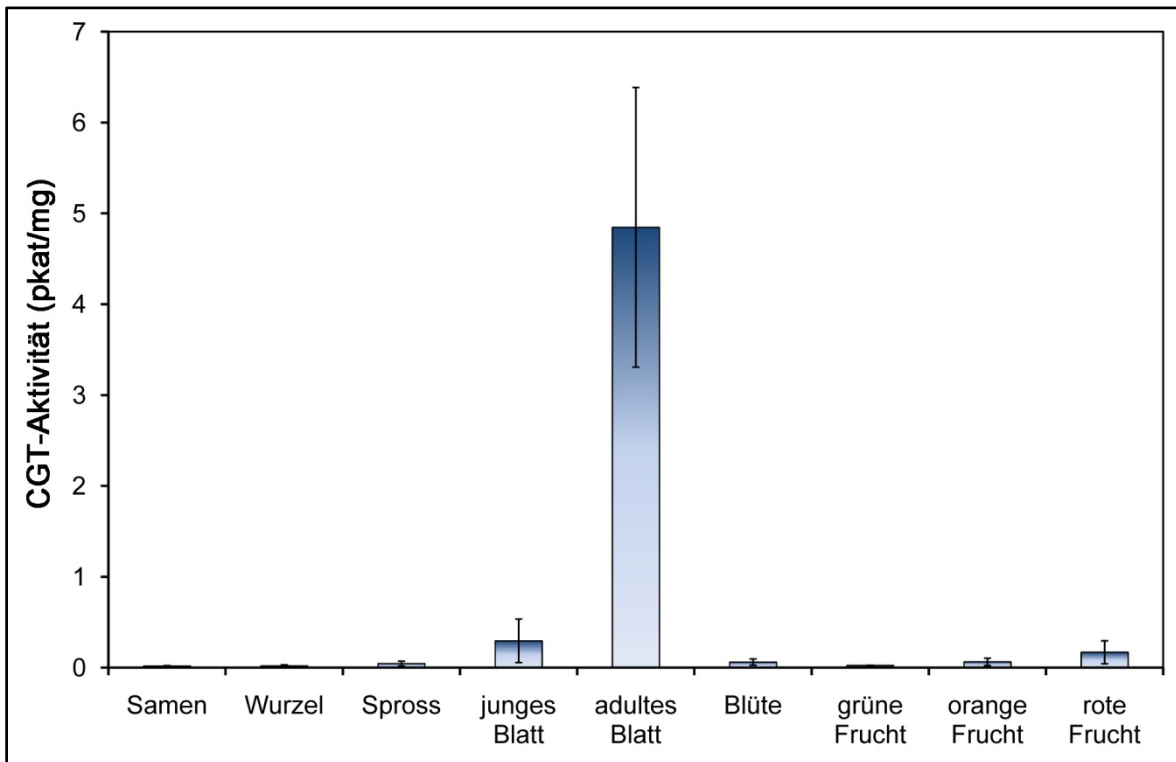


Abbildung 3.20: CGT-Aktivität in Rohextrakten aus verschiedenen Organen von *S. lycopersicum* mit n=3 unabhängigen Proben. Quantifiziert wurde die Bildung von Kaffeoyleglukarat aus Chlorogensäure.

Für die Analysen der Organe wurde erwartet, dass in den untersuchten Geweben mit geringer CGT-Aktivität auch nur wenig Kaffeoyleglukarsäure zu finden sein würde, während in Organen mit hoher Aktivität auch mehr von diesem Metabolit messbar sein sollte. Das konnte für Samen, Wurzel, Spross und Früchte auch bestätigt werden (Abbildung 3.21). Auch der Gehalt an Chlorogensäure war in diesen Organen sehr gering. Sowohl in jungen und adulten Blättern als auch in Blüten konnte ein sehr hoher Anteil an Chlorogensäure gemessen werden. Dagegen war der Gehalt an Kaffeoyleglukarsäure in jungen und adulten Blättern etwa gleich und auf einem recht niedrigen Niveau im Vergleich zu der sehr hohen CGT-Aktivität in adulten Blättern. Auch in Blüten war nur ein geringer Gehalt an Kaffeoyleglukarsäure messbar. Das zeigt wiederum, dass die Menge an Kaffeoyleglukarat anscheinend nicht zwingend von der Aktivität der CGT abhängig ist.

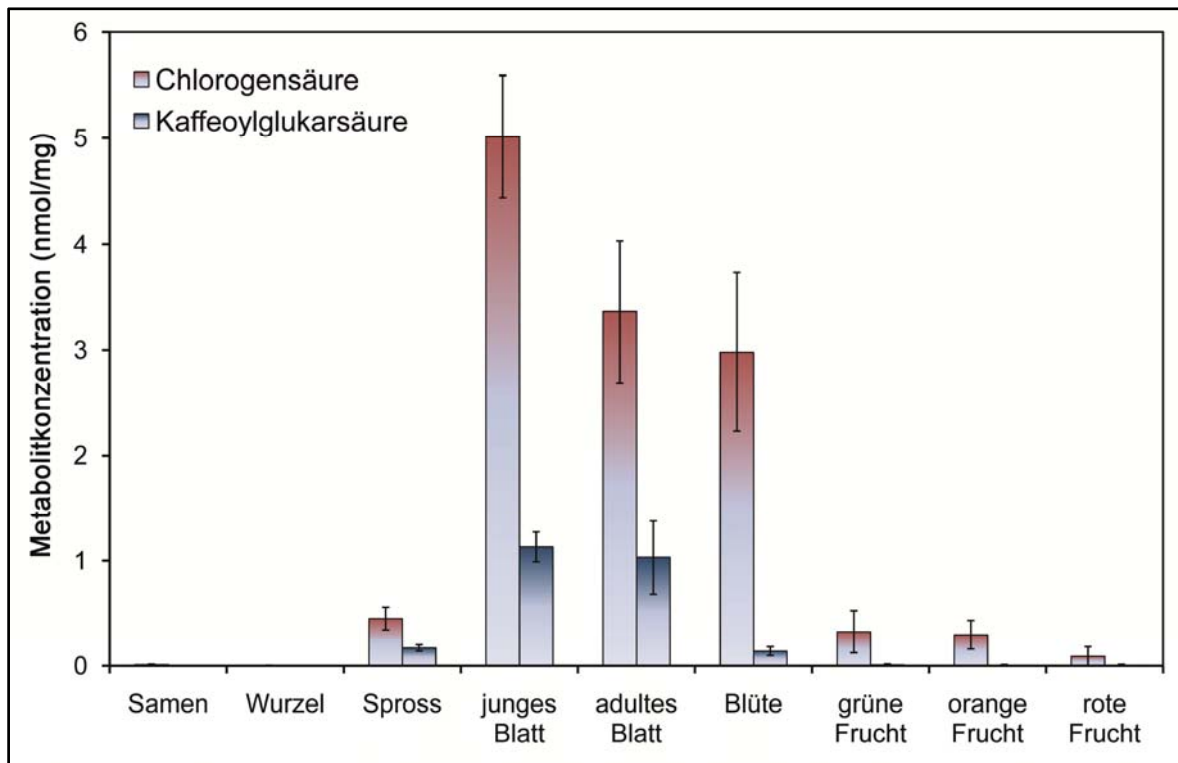


Abbildung 3.21: Analysen der löslichen HCA-Metabolite in Organen von *S. lycopersicum*. Dargestellt ist der Gehalt an Chlorogensäure und Kaffeoylglukarsäure in n=3 Proben. Die Gehalte beider Metabolite wurden mittels HPLC ermittelt.

3.3.2 Auswirkungen der *SICGT*-Supression

Um zu überprüfen, ob das Ausschalten der *SICGT* einen Effekt auf den Phenylpropanstoffwechsel von *S. lycopersicum* hat, sollte das *SICGT*-Gen in der Pflanze supprimiert werden. Dazu wurde die für Pflanzen beschriebene Methode des *Post Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) durch Doppelstrang-RNA-Interferenz (dsRNAi) angewendet. Für das RNAi-Konstrukt wurde zunächst ein 345 bp großes Fragment der *SICGT*-cDNA mit Primern für die Restriktionschnittstellen *SmaI/NcoI* (RNAi-*antisense*) bzw. *NheI/BamHI* (RNAi *sense*) in einer PCR amplifiziert und über die eingefügten Schnittstellen in den Vektor pB35SNGUS subkloniert. Dieser Vektor vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin und enthält zwischen dem 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und dem nos-Terminator aus *A. tumefaciens* ein Subfragment des bakteriellen *uidA*-Genes, welches als Spacer dient. Anschließend wurde die gesamte Expressionskassette über *SpeI/HindIII*-Restriktion in den binären Vektor pLH7000 transformiert (Abbildung 3.22) und durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in *S. lycopersicum* transformiert. Insgesamt konnten durch stabile Transformation des RNAi-

Konstruktes 32 RNAi-Pflanzen erzeugt werden. Die Selektion der Pflanzen erfolgte zunächst auf Phosphinotricin-haltigem Medium. Anschließend wurde mit einer PCR gegen den *uidA*-Spacer überprüft, ob das Konstrukt in der Pflanze vorhanden war. Als Kontrolle dienten 23 Pflanzen, die mit dem Vektor pLH7000 transformiert und durch PCR gegen die Phosphinotricinresistenz-Kassette überprüft wurden. Junge Blätter der transgenen T1-Pflanzen wurden anschließend hinsichtlich Transkriptakkumulation, Enzymaktivität und Gehalt an Kaffeesäureestern untersucht.

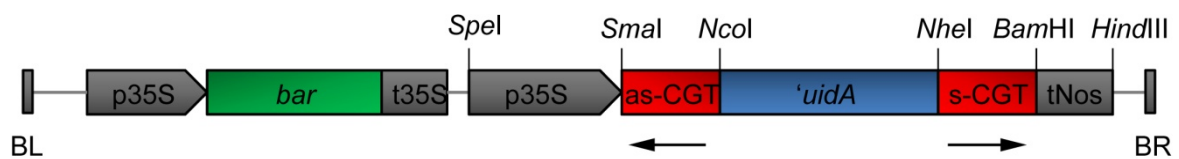


Abbildung 3.22: RNAi-Konstrukt für die Suppression der *SICGT* (pLH-CGT-RNAi). BL und BR: Linke und rechte Bordersequenz, p35S und t35S: 35S-Promotor bzw. -Terminator des Blumenkohlmosaikvirus, *bar*: Phosphinotricin-Acyltransferase (Basta[®]-Resistenz), as-CGT: antisense-SICGT (345 bp), s-CGT: sense-SICGT (345 bp), *uidA*: GUS-Spacer (1023 bp), tNos: Terminator der Nopalinsynthetase. Weiterhin sind die zur Klonierung genutzten Schnittstellen angegeben.

Sowohl die RNAi- als auch die Kontrolllinien (*Empty Vector*, EV) zeigten eine sehr große Variabilität in den Gehalten an Chlorogen- und Kaffeoylglukarsäure als auch in der Enzymaktivität. Zwar konnte in einigen RNAi-Linien eine Absenkung des *SICGT*-Transkriptes im Vergleich zu den Kontrollpflanzen beobachtet werden (Abbildung 3.23 A) und in zwei Linien, RNAi1.1 und RNAi3.1 war außerdem der Gehalt an Chlorogensäure im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 3.23 B). Jedoch zeigte sich auch für das Produkt Kaffeoylglukarsäure eine leichte Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp und den Kontrollpflanzen. Linie RNAi1.1, 3.1 und 6.3 zeigten außerdem im Vergleich zum Wildtyp auch die geringste CGT-Aktivität im Rohextrakt junger Blätter, allerdings variiert die Aktivität bereits in den Kontrollpflanzen sehr stark (Abbildung 2.23 C).

Die Analyse der CGT-Aktivität und der Metabolitengehalte wurde für die Linien RNAi1.1, 3.1 und 6.3 in der T2-Generation fortgesetzt. Zunächst wurden die Samen auf Keimungsmedium ausgelegt und mit Phosphinotricin im Medium selektioniert. Transgene 14 Tage alte Keimlinge wurden dann mittels HPLC auf Aktivität des Enzyms und Gehalt der löslichen Kaffeesäureester hin untersucht.

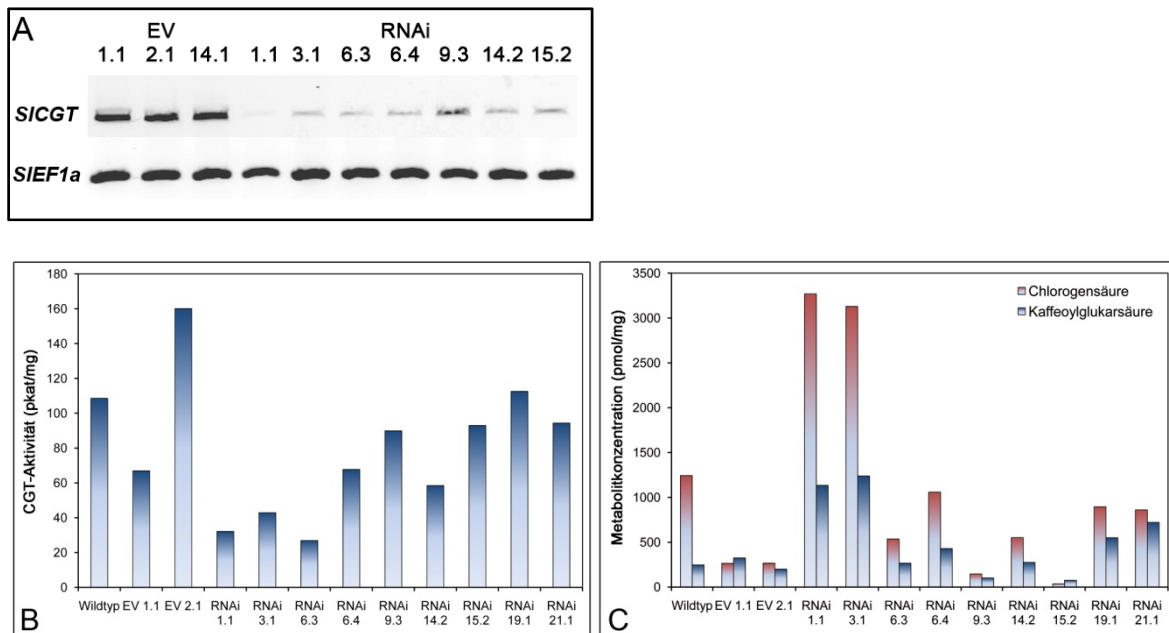


Abbildung 3.23: Suppression der *SICGT* in *S. lycopersicum* in der T1-Generation. (A) Semiquantitative RT-PCR (25 Zyklen) mit RNA aus transgenen Tomatenpflanzen. Es wurden Primer für die *SICGT* und den Elongationsfaktor *EF1α* verwendet. (B) CGT-Aktivität in Rohextrakten aus Blättern transgener Pflanzen; (C) HPLC-Analysen der löslichen HCA-Metabolite transgener Pflanzen. EV= *Empty Vector* (Kontrollpflanzen)

Anhand der Selektion der T2-Pflanzen mittels der Phosphinotricin-Resistenz konnte eine Insertion mehrerer RNAi-Konstrukte in das Tomaten-Genom belegt werden. Bei einer Einzelkopie-Insertion würde man eine 3:1-Verteilung von resistenten zu nicht resistenten Pflanzen erwarten, allerdings waren alle T2-Nachkommen der RNAi-Linien gegen Phosphinotricin resistent. Das heißt, dass alle Pflanzen genetisch sehr unterschiedlich sind. Die Ergebnisse der Analysen ausgewählter RNAi-Linien in der T2-Generation sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist der Gehalt an Chlorogensäure in den Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht, der Gehalt an Kaffeoylglukarsäure ist dagegen signifikant niedriger. Allerdings können keine Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den RNAi-Linien festgestellt werden. Die Aktivität der CGT variiert in allen Linien sehr stark, d. h. eine starke Absenkung, wie für PTGS erwartet, konnte nicht erreicht werden. Die unterschiedlichen Werte sind demnach wahrscheinlich auf die biologische Varianz und nicht auf den RNAi-Effekt zurückzuführen.

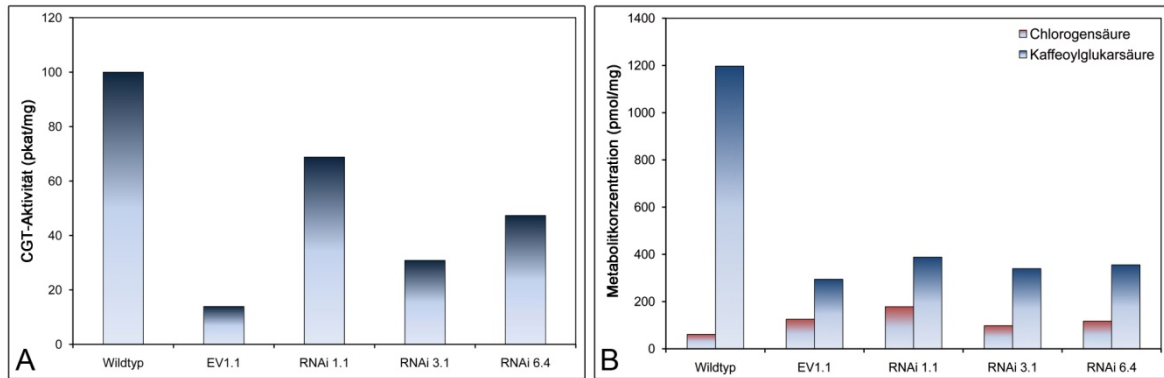


Abbildung 3.24: Analyse der *SICGT*-Suppression in der T2-Generation. CGT-Aktivität in Rohextrakten aus Blättern transgener Pflanzen (A); HPLC-Analysen der löslichen HCA-Metaboliten transgener Pflanzen (B). Als Kontrolle ist jeweils der Wildtyp mit angegeben.

3.3.3 Auswirkungen der *SICGT*-Überexpression

Wie bereits gezeigt, erreicht die *SICGT* ihre höchste Aktivität während der Keimlings- und Primärblattentwicklung. In den anderen Organen der Tomate bzw. in anderen Blättern und späteren Blattstadien konnte nur eine geringe *SICGT*-Aktivität und auch nur ein geringer Gehalt an Kaffeoylglukarsäure gemessen werden. Aus diesen Ergebnissen stellte sich nun die Frage, ob es zu sichtbaren Veränderungen im HCA-Stoffwechsel kommt, wenn die *SICGT* überexprimiert wird.

Für die Überexpression der *SICGT* wurde das Konstrukt für die transiente Transformation von Tabak genutzt (s. Abbildung 3.5) und durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer stabil in Tomate transformiert. Die Selektion der Pflanzen erfolgte zunächst auf Kanamycin-haltigem Medium. Anschließend wurde mit einer PCR gegen das *NptII*-Gen überprüft, ob das Konstrukt stabil in das Genom der Pflanze integriert wurde. Insgesamt konnten 121 transgene Pflanzen erzeugt werden, die das transformierte Plasmid trugen. Als Kontrolle dienten 91 Pflanzen, die mit dem Vektor pBINPLUS transformiert und durch PCR gegen die *NptII*-Kassette überprüft wurden. Junge Blätter der transgenen T1-Pflanzen wurden anschließend hinsichtlich Transkriptakkumulation und Gehalt an Kaffeesäureestern untersucht.

Abbildung 3.25 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer semiquantitativen RT-PCR mit cDNA ausgewählter T1-Pflanzen (A) sowie die Ergebnisse der Metabolitenanalysen (B).

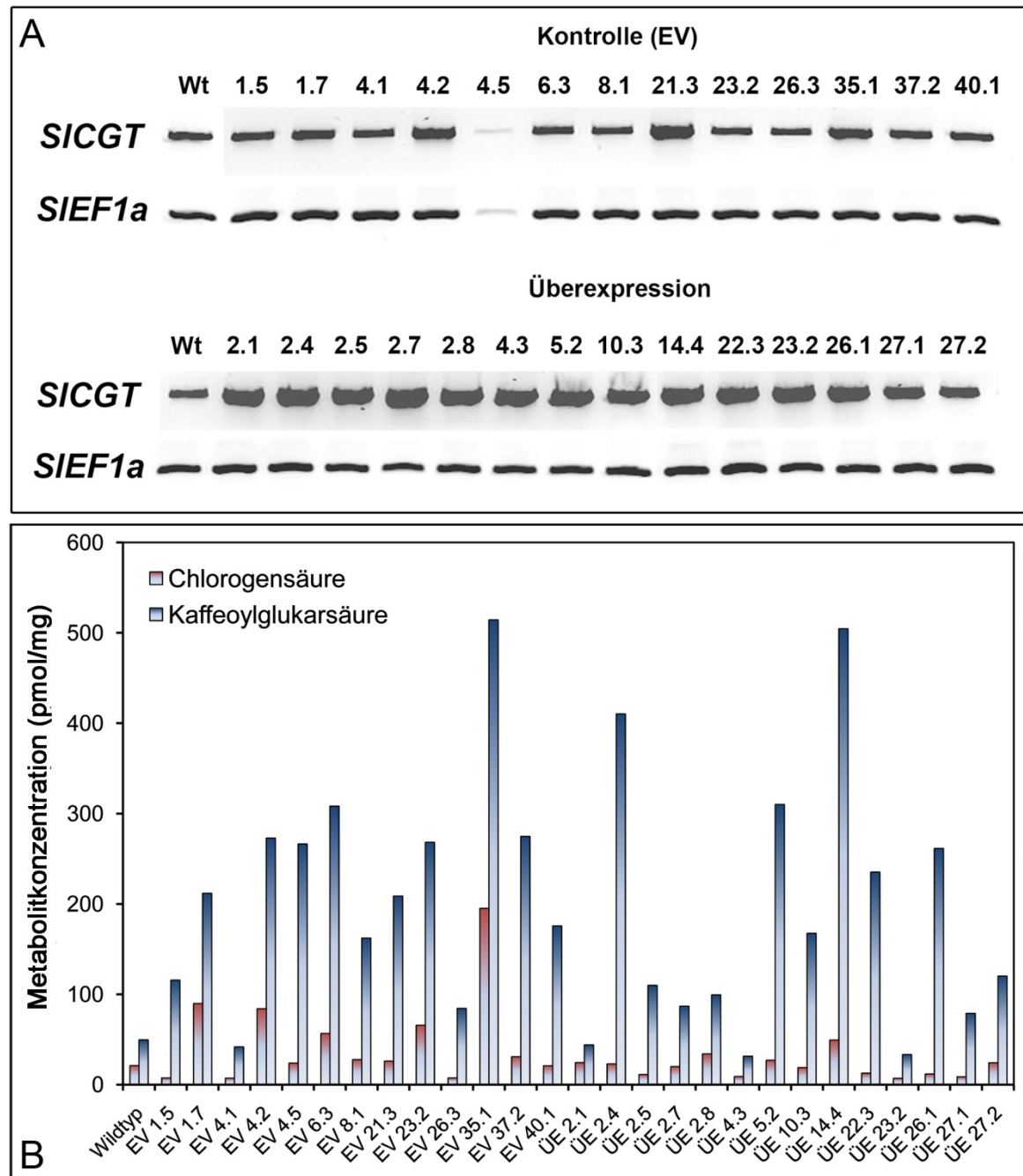


Abbildung 3.25: Überexpression der CGT in *S. lycopersicum*. (A) Semiquantitative RT-PCR (25 Zyklen) mit RNA aus transgenen Tomatenpflanzen. Es wurden Primer für die *SICGT* und den Elongationsfaktor *EF1a* verwendet. (B) HPLC-Analysen der löslichen HCA-Metabolite transgener Pflanzen. Als Kontrolle ist jeweils der Wildtyp mit angegeben.

Das Transkriptniveau der Überexpressionlinien scheint im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht zu sein, allerdings zeigt die Analyse der Metaboliten, dass es wieder starke Schwankungen sowohl in Kontrolllinien als auch in den Überexpressionlinien gibt. Zwar zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp in einigen Linien eine deutliche Erhöhung des

Gehaltes an Kaffeoylglukarsäure, allerdings ist diese Erhöhung auch in einigen Kontrolllinien zu beobachten und daher wahrscheinlich auch hier auf die hohe biologische Variabilität zurückzuführen.

In der T2-Generation wurden zunächst die Kotyledonen junger Pflanzen hinsichtlich Transkriptmenge, Metabolitengehalt und SICGT-Aktivität untersucht, da das Enzym in Keimlingen die höchste Aktivität hat. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 3.26 zusammengefasst.

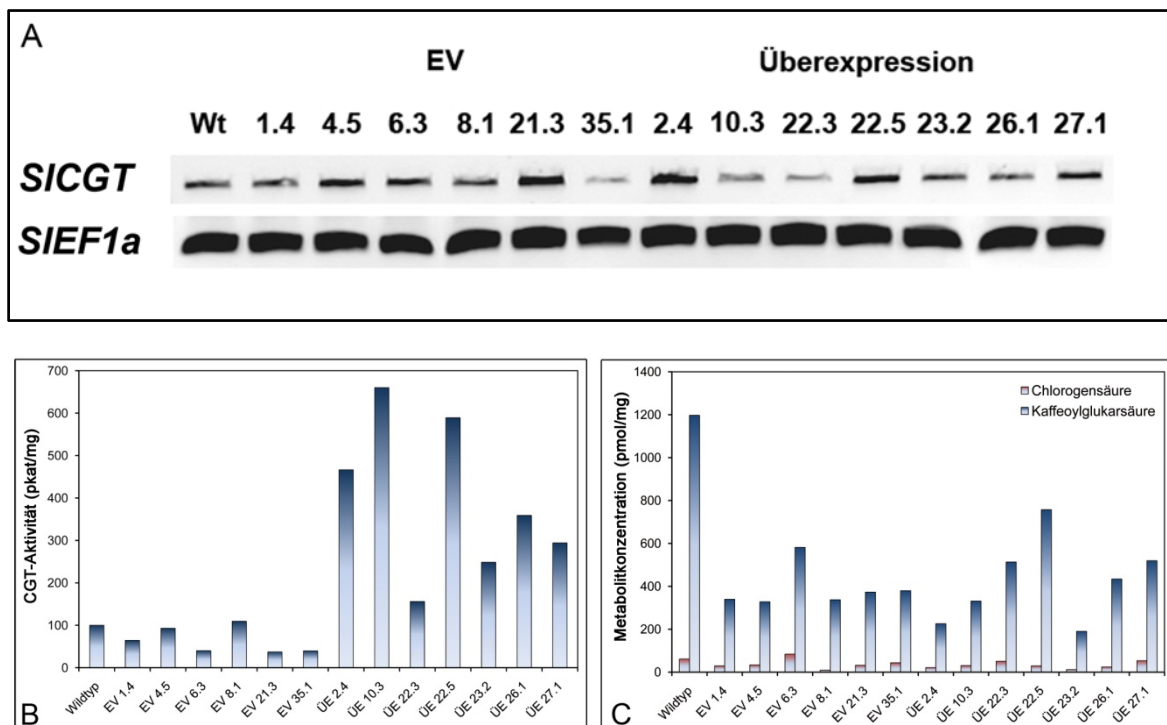


Abbildung 3.26: Analyse der SICGT-Überexpression in der T2-Generation. (A) Semiquantitative RT-PCR (25 Zyklen) mit RNA aus transgenen Tomatenpflanzen, verwendet wurden Primer für die SICGT und den Elongationsfaktor *EF1α*. (B) und (C) HPLC-Analysen der CGT-Aktivität und der löslichen HCA-Metaboliten in Rohextrakten aus Keimblättern transgener Pflanzen. Als Kontrolle ist jeweils der Wildtyp mit angegeben.

Leider zeigte sich auch in der T2-Generation keine deutliche Überexpression auf Transkriptebene. Auch die Metabolitenanalysen zeigten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Überexpressionspflanzen, der Gehalt an Kaffeoylglukarsäure ist sogar geringer als in den Wildtyppflanzen. Allerdings konnte in einigen wenigen Linien eine deutliche Erhöhung der CGT-Aktivität festgestellt werden. Möglicherweise ist der Gehalt an Substrat aufgrund der erhöhten Aktivität der CGT recht bald ausgeschöpft, so dass sich keine messbaren Änderungen der Metabolitengehalte ergeben.

Da die *SICGT*-Aktivität in Wurzel, Spross und in den Früchten sehr gering war, und auch nur Spuren des Produktes Kaffeoylglukarsäure gefunden wurden, sollte sich eine Überexpression hier stärker auswirken, als in Geweben, in denen die *SICGT*-Aktivität ohnehin erhöht war. Allerdings zeigte weder die Analyse der Kaffeesäureestergehalte noch der *CGT*-Aktivität in den ausgewählten Organen der T1-Pflanzen einen signifikanten Unterschied zu den Wildtypkontrollen.

3.4 Immunlokalisation der *SICGT*

Sequenzanalysen weisen darauf hin, dass die *SICGT* als Vorläuferprotein synthetisiert und über ein N-terminales Signalpeptid aus der Zelle heraus in den Apoplasten sekretiert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte das Protein *in planta* mittels eines spezifischen Antikörpers lokalisiert werden. Für die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen die *SICGT* wurde die unlösliche Fraktion *CGT-N* (siehe Abbildung 3.3) aus der heterologen Expression in *E.coli* unter denaturierenden Bedingungen gelöst und mittels Metallaffinitätschromatographie angereinigt. Durch die Firma Eurogentech (Seraing, Belgien) wurde ein Antikörper gegen das unlösliche *CGT*-Protein hergestellt, der sich allerdings in Western Blot-Analysen als nicht spezifisch für die *SICGT* weder in *E. coli*-Extrakten noch in Extrakten aus Tomatenblättern erwies. Daher wurde als Ausweichstrategie die Lokalisation in *N. benthamiana* mit Hilfe transienter Transformation gewählt. Verwendet wurde dafür das Überexpressionskonstrukt der *SICGT* mit C-terminalem His-tag, da ein Nachweis des Fusionsproteins mit einem gegen den His-tag gerichteten Antikörper möglich sein sollte. Fünf Tage nach Inokulation wurden Semidünnschnitte von fixierten und in PEG eingebetteten Tabakblättern angefertigt und mit dem anti-His-tag-Antiserum inkubiert. Allerdings konnte in mikroskopischen Untersuchungen keine Immunmarkierung nachgewiesen werden. Da auch mehrere Wiederholungen keinen Erfolg brachten, sollte die Effektivität der Transformation mittels Western Blot überprüft werden. Dazu wurde der Proteinrohextrakt aus infiltrierten Blättern zunächst über Nickel-NTA-Säulchen gereinigt. Nickel-NTA bindet spezifisch den His-tag des Fusionsproteins und kann daher zur Reinigung solcher Proteine genutzt werden. Der gereinigte Proteinextrakt wurde zunächst mittels *CGT*-Assay auf Aktivität überprüft, in welchem sich die Enzymaktivität eindeutig nachweisen ließ. Allerdings war die Ausbeute

an aktivem Enzym sehr gering und ein Nachweis des CGT-Proteins im Western Blot war nicht möglich. Möglicherweise ist die Proteinmenge in den infiltrierten Blättern zu gering für einen immunocytologischen Nachweis.

4. Diskussion

4.1 Die *SICGT*-cDNA codiert für eine katalytisch aktive Chlorogensäure: Glukarsäure-Kaffeoyltransferase

Um die Funktionalität der isolierten *SICGT*-cDNA zu zeigen, sollte die *SICGT* im Rahmen dieser Arbeit heterolog exprimiert werden. Zur Verfügung standen dafür sowohl pro- als auch eukaryotische Expressionssysteme. Jedoch ist die heterologe Expression gerade bei Enzymen des Sekundärstoffwechsels oftmals kritisch und bedarf vielfältiger Optimierung, da diese Enzyme oft posttranslational modifiziert werden. Auch agieren die reifen Enzyme meist in speziellen Kompartimenten der Pflanzenzelle, wie z.B. Apoplast oder Vakuole, die mit ihren speziellen pflanzlichen Bedingungen in nicht-pflanzlichen Wirten nicht vorkommen.

Einer der am meisten eingesetzten heterologen Wirte für die Überexpression rekombinanter Proteine ist *E. coli*. Neben dem geringen Kostenfaktor ist dieses Bakterium genetisch einfach zu manipulieren, kann schnell zu hohen Zelldichten wachsen und die Expression der Proteine kann durch variable Wachstums- und Induktionsbedingungen verbessert werden. Aus diesen Gründen wurde *E. coli* als erstes Expressionssystem gewählt. Allerdings kann es auch hier Probleme bei der Expression rekombinanter Gene geben. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Codonhäufigkeit entscheidend die Translationseffizienz beeinflusst (Kane 1995). In jedem Organismus werden die 61 möglichen Nukleinsäure-Codons mit unterschiedlicher Häufigkeit benutzt. Die Häufigkeit der genutzten Codons korreliert dabei mit der Anzahl der entsprechenden tRNAs, das heißt, für selten verwendete Codons liegen auch nur wenige tRNAs vor (Dong et al. 1996). Um dieses Problem zu umgehen, wurde der *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus (DE3)-RIL genutzt, der zusätzliche Kopien der *argU*, *ileY* und *leuW* tRNA-Gene trägt, die tRNAs für die Erkennung der Triplets AGA/AGG, AUA und CUA codieren. Gerade das Codon AGA für Arginin wird in *S. lycopersicum* mit fast 100%iger Häufigkeit für die Codierung dieser Aminosäure genutzt. Nach heterologer Expression der *SICGT* ohne die putative Signalsequenz wurde das Protein durch Markierung der N-terminal fusionierten 6 x His-Sequenz im Western Blot in der unlöslichen Proteinfraction detektiert. Allerdings war es nicht möglich, ein funktionelles His-tag-Fusionsprotein der *SICGT* herzustellen. Auch

verschiedene Optimierungsschritte, wie eine niedrigere Anzuchttemperatur und unterschiedliche Konzentrationen des Induktors brachten keinen Erfolg. Nicht nur in der Literatur finden sich ähnliche Angaben für den Versuch der funktionellen Proteinexpression in *E. coli*, auch in unserer Arbeitsgruppe sind diese Schwierigkeiten bekannt (Weier 2006). Ein bekanntes Problem ist die unkorrekte Faltung des zu exprimierenden Proteins in Bakterien, da hierzu oft sogenannte Faltungshelfer (Chaperone) benötigt werden, die sich in pro- und eukaryotischen Systemen unterscheiden (Hartl 1996). Außerdem sind Bakterien nicht in der Lage, posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Glycosilierungen, Phosphorylierungen und die Ausbildung von Disulfidbrücken, durchzuführen. Diese sind jedoch für die Funktionsfähigkeit eines eukaryotischen Proteins meist notwendig. Da für die CGT mehrere posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Glycosilierungen und Disulfidbrücken, vorhergesagt wurden, ist ein Einfluss dieser auf die Funktionalität des Enzyms nicht auszuschließen. Nicht-funktionale, unkorrekt gefaltete Proteine werden in heterologen Expressionswirten häufig als unlösliche Proteine in sogenannten *inclusion bodies* deponiert. Proteine in solchen Einschlusskörperchen können nur durch vollständige Denaturierung wieder gelöst werden, was experimentell für die CGT bestätigt wurde. Aktives Protein lässt sich dann allerdings nur durch eine aufwendige *in vitro* Rückfaltung erzeugen (Hutchinson et al. 2006). Computergestützte Analysen der SICGT ließen vermuten, dass das Enzym als Vorläuferprotein synthetisiert und dann über eine N-terminale Signalsequenz in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und von dort über den sekretorischen Weg in den Apoplasten transportiert wird. Das Vorhandensein eines Signalpeptids legt nahe, dass bestimmte Prozessierungen notwendig sind, die typischerweise im ER von Eukaryoten stattfinden und in *E. coli* nicht möglich sind. Da es nicht möglich schien, die SICGT in *E. coli* funktionell zu exprimieren, wurde als nächste Strategie die Expression in der Hefe *S. cerevisiae* als eukaryotisches Expressionssystem gewählt.

Die funktionelle Expression katalytisch aktiver Acyltransferasen aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel in *S. cerevisiae* ist bereits in der Literatur beschrieben. So konnten beispielsweise eine Serin-Carboxypeptidase-ähnliche (SCLP)-Isobutyryltransferase aus *L. penneli* (Li und Steffens 2000) und das in *A. thaliana* für die Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT) codierende *SNG2*-Gen (Shirley und Chapple 2003) in diesem Wirt heterolog exprimiert werden. Auch in unserer Arbeitsgruppe gelang in einem optimierten *S. cerevisiae*-Stamm die funktionelle Expression der SCLP-Enzyme Sinapoyl-

glucose:Malat-Sinapoyltransferase (SMT) aus *A. thaliana* (Stehle, Stubbs et al. 2008) sowie der SCT aus *B. napus* (J. Vollrath, unveröffentlicht). Zudem kombiniert die Expression in Hefen die Vorteile der schnellen und kostengünstigen Kultivierung mit der Fähigkeit zur post-translationalen Modifikation, da Hefen aufgrund eines entsprechenden sekretorischen Stoffwechselweges über die Möglichkeit der korrekten Modifikation und Sekretion heterologer Proteine verfügen. Der Vorteil von *S. cerevisiae* gegenüber anderen Hefe-Expressionssystemen, wie z. B. *Pichia pastoris* ist, dass für dieses System episomale Expressionsplasmide wie der pYES-Vektor zur Verfügung stehen, die im Vergleich zu Insertionsplasmiden eine höhere Gendosis für das zu exprimierende Protein ermöglichen. In unserer Arbeitsgruppe stand zudem mit dem Expressionsplasmid pDIONYSOS eine modifizierte Version des pYES-Vektors zur Verfügung, die durch Insertion einer *leu2-d*-Gen-Variante eine erhöhte Kopienzahl aufweist (Stehle, Stubbs et al. 2008). Leucin-auxotrophe *S. cerevisiae*-Zellen, die den konstruierten pDIONYSOS-Vektor tragen, kompensieren unter Leucin-Mangel die geringe *leu2-d*-Expression durch Erhöhung der Vektorkopienzahl, was im Endeffekt zu einer um den Faktor 3,5 verbesserten Expression des heterologen Proteins führte (Stehle 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die *SICGT*-cDNA in *S. cerevisiae* heterolog exprimiert werden, allerdings war die nachgewiesene Enzymaktivität sehr gering. Dies kann mehrere Ursachen haben. So zeigte der Vergleich des Codon-Gebrauchs zwischen *S. cerevisiae* und dem *SICGT*-Gen nur einen *codon adaptation index* (CAI) von 82%. Der CAI ist ein Maß für die Anpassung einer gegebenen Sequenz an den optimalen Codon-Gebrauch stark exprimierter Gene eines Referenzorganismus (Sharp und Li 1987; Sharp et al. 1988). Des Weiteren trägt das CGT-Vorläuferprotein ein Signalpeptid, welches für eine Sekretion des Proteins sorgt. Es wäre möglich, dass dieses pflanzliche Signalpeptid nicht optimal für die Prozessierung in Hefe ist.

Um die heterologe Expression in Hefe zu steigern, bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Neben der Codon-Optimierung wäre die Verwendung eines sekretorischen Hefestammes, wie für die AtSCT beschrieben (Shirley und Chapple 2003) und der Austausch des nativen Signalpeptids durch Signalpeptide vakuolärer Hefeproteine, wie z. B. die Zielsequenz der Proteinase A (van den Hazel et al. 1993), oder durch Signalpeptide für die Sekretion, wie z. B. der Signalsequenz des *α -mating*-Faktors (Zsebo et al. 1986; Bitter et al. 1992), denkbar. Zunächst sollte allerdings ein weiteres eukaryotisches Expressionssystem getestet werden.

Die Wahl von *N. benthamiana* als pflanzliches Expressionssystem erhöht die Wahrscheinlichkeit einer korrekten posttranslationalen Modifikation des pflanzlichen *SICGT*-Enzyms. Eine einfache und schnell durchzuführende Methode liefert hier die transiente Expression des Proteins in den Blättern von *N. benthamiana* (Kapila, De Rycke et al. 1997). Dieses System hat den Vorteil, dass die Expression des rekombinanten Proteins zeitsparend vollzogen werden kann, da die Pflanzen nicht regeneriert werden müssen und das Protein bereits wenige Tage nach der Transformation aus den Blättern isoliert werden kann. Die heterologe Expression von *SICGT* in Tabak erfolgte unter Kontrolle des starken lichtregulierten Promotors der kleinen Rubisco Untereinheit (*Rbcs1*) aus *Asteraceous chrysanthemum*, da für dieses System in Pflanzen eine achtmal höhere Expressionsrate als bei Verwendung des 35S-Promotors beschrieben wurde (Outchkourov, Peters et al. 2003). In diesem eukaryotischen Expressionssystem gelang die funktionelle Expression der *SICGT* (Abbildung 3.6). Im Proteinrohextrakt der infiltrierten Blattbereiche konnte eine CGT-Aktivität von 2,9 nkat mg⁻¹ Protein gemessen werden. Dies bedeutet im Vergleich zur höchsten spezifischen Aktivität in den Kotyledonen der Tomate (ca. 130 pkat mg⁻¹, vgl. Abbildung 3.21) eine enorme Erhöhung der Aktivität. Allerdings ist eine eindeutige Quantifizierung in diesem System schwierig. Man muss davon ausgehen, dass die Gendosis in den transformierten Bereichen immer gleich ist, und man möglichst wenig untransformiertes Gewebe für die Proteinextraktion ausschneidet. Als Kontrolle für die Transformationseffizienz können Western Blot-Analysen mit gleichen Proteinmengen oder parallele Quantifizierung eines Reportergenes (z. B. GUS) aus der gleichzeitigen Transformation mit einem zweiten Plasmid dienen. Leider stand kein CGT-Antikörper zur Verfügung, so dass eine Quantifizierung über Western Blot-Analysen nicht möglich war. In späteren Analysen wurde die parallele Quantifizierung eines Reportergenes als Kontrollmöglichkeit gewählt.

Die Ergebnisse der Expression in Tabak zeigen deutlich, dass ein angefügter 6 x His-tag an den C-Terminus der *SICGT*-Sequenz zu einer Beeinträchtigung der Enzymaktivität führt. So konnte für das *SICGT*-His-tag-Fusionsprotein in *N. benthamiana* nur eine Enzymaktivität von 0,87 nkat mg⁻¹ gemessen werden, was einem Aktivitätsverlust von etwa 70 % entspricht. Es scheint, als hätte der angehängte 6x-His-tag einen negativen Einfluss auf die CGT-Aktivität, womöglich aufgrund seiner positiven Ladung oder durch Veränderung der Proteinfaltung. Trotzdem ist die katalytische Aktivität des heterolog exprimierten His-tag-Fusionsproteins aus dem Tabakblatt immer noch wesentlich höher als

die des nativen Enzyms im Proteinrohextrakt der Tomate, so dass eine Reinigung des rekombinanten Proteins über Metallaffinitätschromatografie möglich schien.

4.2 Die SICGT als GDSL-Lipase-ähnliches Enzym

Sequenzanalysen der isolierten SICGT-cDNA ergaben überraschend, dass das Gen für ein GDSL-Lipase-ähnliches Protein codiert, und somit zur Superfamilie der SGNH-Hydrolasen gezählt werden kann. Allen SGNH-Hydrolasen gemein sind fünf konservierte Sequenzblöcke und vier unveränderliche Aminosäurereste Ser, Gly, Asp und His in den Blöcken I, II, III und V.

Die GDSL-Lipasen sind als lipolytische Enzyme aktiv an der Hydrolyse zahlreicher Ester beteiligt. Anders als das bei Lipasen übliche GxSxG-Motiv weisen sie ein GxSxxxxG-Motiv in der Nähe des N-Terminus auf (Upton und Buckley 1995). Des Weiteren besitzen GDSL-Lipasen fünf konservierte Sequenzblöcke, wobei Block I das GDSL-Motiv überdeckt. Innerhalb dieses Motives befindet sich auch das katalytisch aktive Serin, das zusammen mit einem Aspartat und einem Histidin die katalytische Triade bildet. Auch besitzen GDSL-Lipasen Aminosäurereste für die Ausbildung einer Oxyanion-Tasche (meist Serin, Glycin und Asparagin) (Molgaard et al. 2000). Im Allgemeinen ist für Enzyme dieser Familie eine Struktur aus zahlreichen β -Faltblättern und α -Helices in alternierender Anordnung charakteristisch. Die Substratbindestelle zwischen dem zentralen β -Faltblatt und einer langen α -Helix ist extrem flexibel und kann durch Konformationsänderungen die Bindung und Umsetzung verschiedener Substrate ermöglichen. Aufgrund ihres multifunktionellen Charakters eignen sich die GDSL-Lipasen für industrielle Anwendungen, so dass sie nicht nur Nahrungsmitteln, Düften, Kosmetika und Textilien zugesetzt werden, sondern auch in der Pharmazie und Waschmittelindustrie zum Einsatz kommen (Derewenda 1994; Ling, Zhao et al. 2006).

Bisherige Studien haben zur Aufklärung der Struktur, der katalytischen Mechanismen und biochemischen Eigenschaften mikrobieller GDSL-Enzyme geführt. So konnte zum Beispiel für die Thioesterase TEP-I, eine GDSL-Lipase aus *E. coli*, eine breit gefächerte hydrolytische Aktivität gegenüber drei Substratklassen, u.a. Acyl-CoAs, aromatische Ester und Aminosäurederivate, gezeigt werden (Lee et al. 1997). Kristallisationsexperimente zeigten, dass TEP-I bei niedrigen pH-Werten als Monomer vorliegt, während sich in

höheren pH-Bereichen ein Tetramer bildet. Sowohl die monomere als auch die tetramere Form sind katalytisch aktiv. Kristallstrukturen für weitere GDSL-Enzyme, z. B. aus *Pseudomonas fluorescens* und *E. coli* sind ebenfalls verfügbar (Kim et al. 1993; Li et al. 2000; Lo et al. 2000; Lo, Lin et al. 2003).

Seit kurzem steht die Erforschung der Eigenschaften und Funktionen pflanzlicher GDSL-Lipasen im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Zahlreiche Enzyme wurden bereits isoliert, kloniert und charakterisiert. So konnte aus dem Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*) ein Enzym dieser Familie isoliert werden, welches hydrolytische Aktivität gegenüber Lipiden und anderen Estern zeigt, bei Menschen Allergien auslösen kann und vermutlich in der Abwehr eine Rolle spielt (Arif et al. 2004). In Arabidopsis wurden bereits mehrere GDSL-Lipasen identifiziert. Arab-1 zeigt *in vitro* z. B. lipolytische Aktivität gegenüber Tween80, allerdings ist über das natürliche Substrat bisher nichts bekannt (Brick, Brumlik et al. 1995). GLIP1, eine weitere GDSL-Lipase aus *A. thaliana*, besitzt neben der Lipaseaktivität auch eine antimikrobielle Funktion. Mikroskopische Analysen zeigten, dass durch die Inkubation von *Alternaria brassicicola*-Sporen mit rekombinanten GLIP1 morphologische Änderungen verursacht werden, durch welche die Zellwände der Sporen direkt zerstört werden. Der genaue Mechanismus dieser Zellwandzerstörung ist allerdings noch nicht bekannt. Auch scheint das Enzym systemische Resistenz gegenüber diesem Pathogen auszulösen. In Kombination mit dem Ethylen-Signalweg scheint dieses Enzym daher eine Schlüsselfunktion in der Resistenz von Arabidopsis gegenüber *A. brassicicola* zu spielen (Oh et al. 2005). Vor kurzem wurde außerdem gezeigt, dass GLIP2, ein Enzym aus der gleichen Familie wie GLIP1, möglicherweise durch negative Regulation des Auxin-Signalweges Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* vermittelt. Allerdings blieb die direkte Verbindung zwischen der GLIP2-Lipase und dem Auxin-Signalweg ungeklärt. (Lee et al. 2009). Des Weiteren konnten aus der Pollenhülle von *A. thaliana* sechs extrazelluläre GDSL-Lipasen isoliert werden (Mayfield et al. 2001) und aus keimenden Sonnenblumensamen (*Helianthus annuus*) wurde ein Enzym gereinigt, welches Fettsäure-Acylester hydrolysieren kann (Teissere et al. 1995).

Physiologisch gesehen sind die bisher identifizierten pflanzlichen GDSL-Lipasen an der Regulation der pflanzlichen Entwicklung, Morphogenese, Metabolismus von Sekundärstoffen und Abwehrprozessen beteiligt. Allen gemein ist neben der Fähigkeit zur

Hydrolyse das breite Substratspektrum, welches typisch für die Familie der GDSL-Lipasen ist.

Die meisten der bisher untersuchten GDSL-Lipasen wurden anhand ihrer hydrolytischen Aktivität gegenüber synthetischen Substraten charakterisiert, während ihre Funktion *in planta* weiter ungeklärt bleibt. Es gibt bisher nur wenige Beispiele für GDSL-Lipasen, deren Substrate aus dem Sekundärstoffwechsel bekannt sind. So konnte z. B. für die Acetylajmalan-Esterase (AAE) aus der Indischen Schlangenzunge (*Rauvolfia serpentina*) gezeigt werden, dass sie Acetylnorajmalin zu Norajmalin, einem Zwischenprodukt der Ajmalin-Biosynthese, umsetzt (Ruppert et al. 2005). Aus Raps wurde kürzlich die in den Abbau der phenolischen Samenkomponente Sinapoylcholin (Sinapin) involvierte Lipase BnLip2 (=Sinapinesterase BnSCE3) isoliert, die codierende cDNA kloniert und das Enzym nach heterologer Überexpression molekular charakterisiert (Ling, Zhao et al. 2006; Clauß, Baumert et al. 2008). Das reife Protein zeigt nicht nur Sinapinesterase-Aktivität, sondern auch ein breites Spektrum hydrolytischer Aktivitäten gegenüber anderen Cholinestern. Auch für die in dieser Arbeit näher untersuchte SICGT sind die Substrate bekannt. Dieses Enzym zeigt im Vergleich zu den aus dem Sekundärstoffwechsel beschriebenen GDSL-Lipasen jedoch sowohl veränderte Substrat- als auch Funktionsspezifität. So zeigt die SICGT Regiospezifität gegenüber dem Acyldonor Chlorogensäure, was sich darin äußert, dass die 3-*O*- oder 4-*O*-Isomere der Chlorogensäure oder die verwandten 3-*O* und 5-*O*-4-Cumarouylchinasäuren nicht akzeptiert werden. Das gleiche gilt in Bezug auf den Acylakzeptor; hier werden außer Glukarsäure und Galaktarsäure keine anderen Substrate umgesetzt. Hinsichtlich der Funktionsspezifität ist bedeutsam, dass die CGT die Fähigkeit von GDSL-Lipasen wie BnLip2 oder AAE zur Hydrolyse verloren hat und statt dessen ausschließlich katalytische Acyltransferase-Aktivität vermittelt.

Eine phylogenetische Analyse gibt Aufschluss über die Verwandtschaft mit Enzymen aus der Familie der GDSL-Lipasen. Zu erkennen ist, dass die SICGT mit potentiellen Lipasen der pflanzenspezifischen SGNH-Familie clustert. Bei den bereits charakterisierten Proteinen handelt es sich durchweg um Hydrolasen. Dies deutet darauf hin, dass die CGT aus hydrolytischen Vorläufer-Enzymen für die Übernahme der Acyltransferase-Funktion im Sekundärstoffwechsel rekrutiert wurde (Abbildung 4.1). Allerdings sind die meisten der CGT-verwandten Proteine noch nicht funktionell charakterisiert, was konkrete Schlußfolgerungen erschwert.

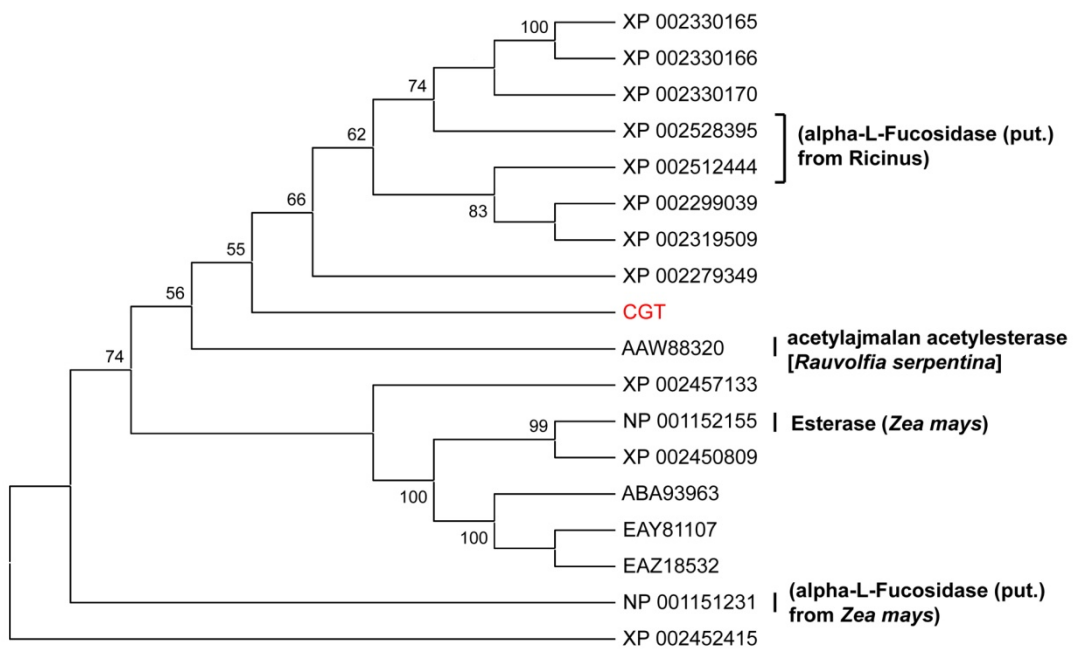


Abbildung 4.1: Phylogenetische Analyse CGT-verwandter Proteine. Der phylogenetische Baum wurde auf Grundlage der Proteinsequenzen mit dem Programm MEGA4 (Tamura et al. 2007) unter Verwendung des *Maximum Parsimony* Algorithmus (Eck 1966) erstellt. Bootstrap-Werte über 50 sind dargestellt. Die Beschreibung der einzelnen Proteine ist im Anhang (Tabelle A.3) zu finden.

Die vier Sequenz-Blöcke, die bei allen Mitgliedern der SGNH-Hydrolasen hoch konserviert sind, konnten auch für die CGT-verwandten Enzyme identifiziert werden (Akoh, Lee et al. 2004; Ling, Zhao et al. 2006). In diesen Blöcken, die in Abbildung 4.2 dargestellt werden, finden sich sowohl die Aminosäuren der putativen katalytischen Triade für die katalytische Lipase-Aktivität (Ser27, Asp162 bzw. Asp328, His331) als auch das GDSL-Motiv wieder (Akoh, Lee et al. 2004). Die starke Konservierung dieser Sequenzmotive legt die Vermutung nahe, dass in der *S/CGT* diese katalytische Triade für den Acyltransfer optimiert wurde. Eine ähnliche Optimierung ist bereits für die Gruppe der SCPL-Acyltransferasen beschrieben (Stehle et al. 2008). Die konservierten Aminosäurereste der postulierten katalytischen Triade der *S/CGT*, Ser27, His331 und Asp162 bzw. Asp328, wurden mittels ortgerichteter Mutagenese auf ihre katalytische Funktion in der *S/CGT* untersucht. Die Mutantenvarianten Ser27Ala und Asp328Ala zeigten eine Verminderung der Aktivität um 13 bzw. 40 %, die Variante Asp162 zeigte 39 % weniger Aktivität als das Wildtyp-Protein. Die Mutante His331Ala unterschied sich hinsichtlich der Aktivität nicht signifikant vom Wildtyp-Protein. Die unerwartet geringe Reduktion der Aktivität weist darauf hin, dass die vom katalytischen Zentrum der GDSL-

Lipasen abgeleitete putative katalytische Triade nicht als solche in die Acyltransferase-Reaktion der CGT involviert ist. Es scheint, als würde die SICGT ein bisher unbekanntes katalytisches Motiv für die spezifische Chlorogensäure-abhängige Kaffeoyltransferase-Reaktion nutzen, welches allerdings, wie in den durchgeführten Hemmversuchen gezeigt wurde, ein katalytisch aktives Serin enthalten sollte. Auch der vollständige Verlust der hydrolytischen Aktivität deutet daraufhin, dass sich hier ein anderes katalytisches Zentrum ausgebildet hat. Um die Struktur-Funktionsbeziehungen der SICGT weiter aufzuklären, sollten weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel kinetische Analysen der Acyltransferase-Reaktion erfolgen, sowie nach Optimierung der heterologen Expression die Kristallisierung des Proteins sowie die Ableitung der Kristallstruktur in Angriff genommen werden.

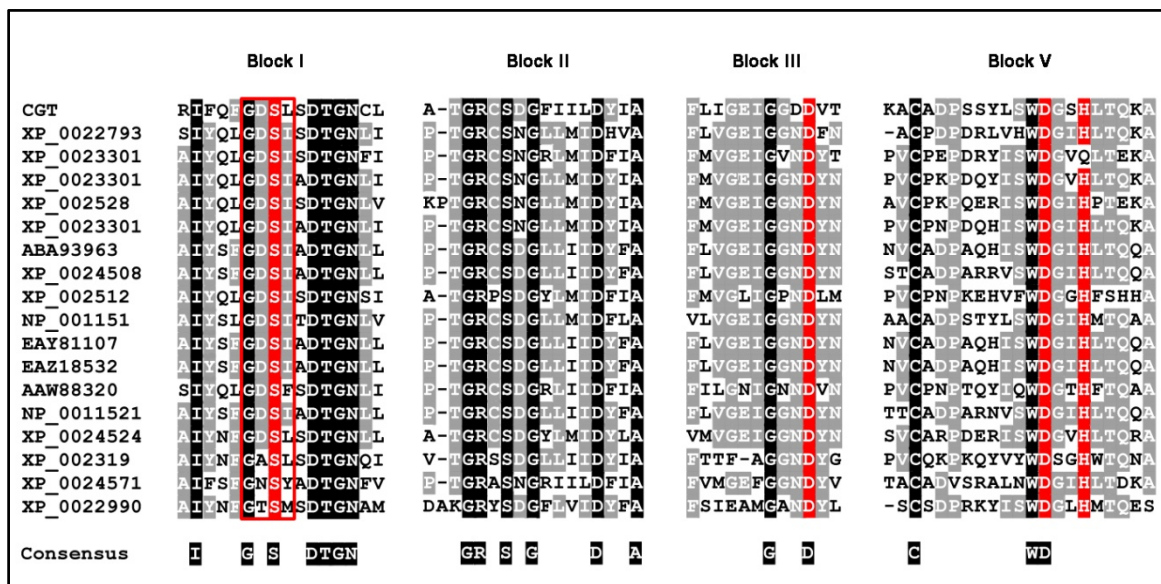


Abbildung 4.2: Aminosäure-Alignment der vier konservierten Sequenzblöcke der GDSL-Lipasen. Die Aminosäuren der putativen katalytischen Triade (Ser27 in Block I, Asp162 in Block III/Asp328 in Block V, His331 in Block V) sind rot markiert. Konservierte Aminosäuren sind in schwarz (absolut konserviert) und in grau markiert. Übereinstimmende Aminosäuren (Consensus) sind unter dem Alignment aufgeführt. Das GDSL-Motiv ist rot eingerahmt. Eine genaue Bezeichnung der Proteine befindet sich im Anhang (Tabelle A.3).

4.3 Gezielte Veränderung der SICGT-Expression und ihr Einfluss auf den Stoffwechsel

Überexpression und Suppression der *SICGT* sollten Hinweise auf die Bedeutung der CGT im Sekundärstoffwechsel der Tomate liefern. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der erzeugten Überexpressions- und RNAi-Linien diskutiert werden.

4.3.1 Überexpression der *SICGT*

Für die Überexpression der *SICGT* wurde die codierende Sequenz des Enzyms mit dem starken Promotor der kleinen Rubisco Untereinheit (*Rbcs1*) aus *Asteraceous chrysanthemum* fusioniert und stabil in das Genom der Tomate integriert. Für die T1-Generation konnte nur eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge im Vergleich zu den Kontrolllinien detektiert werden. Demzufolge zeigten auch die Metabolitkonzentrationen keine eindeutigen Unterschiede zwischen Kontrollen und Überexpressionslinien, die Metabolitengehalte schwankten in allen untersuchten Linien sehr stark.

In der T2-Generation wurden sowohl Kotyledonen als auch Wurzel, Spross und Früchte transgener Linien hinsichtlich Transkriptmenge, Metabolitengehalt und CGT-Aktivität näher untersucht. Zunächst erfolgte eine Segregationsanalyse auf Kanamycin-haltigem Medium, durch welche die Insertion mehrerer Überexpressions-Konstrukte in das Tomaten-Genom belegt werden konnte. Auch das Vorhandensein der Expressionskassette wurde mittels PCR überprüft. Die zu untersuchenden Pflanzen wurden dann unter Langtagbedingungen angezogen, um den lichtregulierten Promotor zu induzieren. In der T2-Generation konnten keine Unterschiede im Transkript- und Metabolitengehalt zwischen Überexpressions- und Kontrolllinien festgestellt werden. In einigen wenigen Linien zeigte sich zwar eine deutliche Erhöhung der CGT-Aktivität in den Blättern, die jedoch nicht mit einer Erhöhung der Transkriptmenge oder Veränderungen im Metabolitengehalt korrelierten. Allerdings zeigten bereits die Analysen junger und adulter Blätter des Wildtyps, dass hier die Transkriptabundanz nicht mit der Enzymaktivität korreliert, was auf eine posttranslationale Regulation der Enzymaktivität hinweist. In den untersuchten Wurzeln, Sprossen und Früchten zeigte sich keine Veränderung der Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen.

Nun stellt sich die Frage, warum der Gehalt an Kaffeoylglukarsäure trotz erhöhter CGT-Aktivität in der T2-Generation nicht ansteigt. Möglich wäre eine Abschöpfung des Produktes für andere, bisher unbekannte Stoffwechselwege, oder eine ebenfalls unbekannte Regulation dieses Stoffwechselweges, der verhindert, dass zu viel Kaffeoylglukarsäure gebildet wird. Auch die Größe des vorhandenen Substratpools kann eine entscheidende Rolle spielen. Möglicherweise ist die Verfügbarkeit der Substrate der limitierende Faktor, während die Enzymaktivität im Überschuss vorhanden und daher unkritisch ist. Diese Möglichkeit wurde zum Beispiel für einige Enzyme des Primärstoffwechsels in sich entwickelnden Raps-Embryos gezeigt (Junker et al. 2007). Des Weiteren gelang es in unserer Arbeitsgruppe nicht, durch Überexpression der *UGT84A*-Gene in Arabidopsis Änderungen im Gehalt von HCA-Glucose-Estern hervorzurufen. Auch hier scheint die Verfügbarkeit von HCAs limitierend zu sein (Meissner et al. 2008). Möglicherweise wirkt sich eine Überexpression der *SICGT* auch nur unter bestimmten Umweltbedingungen aus. Um dies näher zu untersuchen, müssten die Pflanzen der T2-Generation unter verschiedenen Umweltbedingungen angezogen oder z. B. durch Pathogene oder mechanische Verletzungen gestresst und dann noch einmal näher analysiert werden. Allerdings konnten diese Analysen im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.3.2 Suppression der *SICGT* durch RNA-Interferenz

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Verminderung der *SICGT*-Aktivität Aufschluss über die biologische Bedeutung dieses Enzyms geben.

Eine Möglichkeit zur Herstellung von Pflanzen mit verringerter oder abgeschalteter CGT-Aktivität ist die Nutzung von Doppelstrang-RNA-Interferenz (dsRNAi; (Fire et al. 1998)). Die Beeinflussung der Genfunktion durch das indirekte Einbringen von dsRNA in einen Organismus wurde zunächst in Pflanzen entdeckt (Napoli et al. 1990). Hier führte die Übertragung eines Gens, das für die Chalcon-Synthase codiert, in Petunien nicht zur der beabsichtigten und erwarteten Verstärkung der Blütenfarbe, sondern zu einem partiellen Verlust der Färbung. Dieses Phänomen wurde als *Cosuppression* benannt, da hierbei nicht nur die Expression der induzierten Transgene, sondern auch die Ausbildung der Merkmale entsprechender homologer, endogener Gene unterdrückt wurde.

Der Mechanismus des *Post Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) basiert darauf, dass in die Zelle eingebrachte dsRNA als fremd erkannt und die dazu homologe mRNA des Zielgens abgebaut wird. PTGS ermöglicht das gezielte Abschalten einzelner Gene oder Gruppen von einander ähnlichen Genen (Smith et al. 2000; Wesley et al. 2001; Wesley et al. 2004). Durch die Wahl eines spezifischen Promotors für die Expression der dsRNAi-Kassette ist es außerdem möglich, bestimmte Gene gewebespezifisch zu supprimieren. Die biologische Funktion des PTGS liegt vermutlich in der Abwehr von viralen Infektionen und der Inaktivierung von Retrotransposons.

Leider gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht, transgene Tomatenpflanzen mit verminderter SICGT-Aktivität zu erzeugen. Zwar gelang die Regeneration von 32 Pflanzen aus den transformierten Kalli, und einige Linien zeigten in der T1-Generation auch eine Verminderung der Transkriptmenge für SICGT. In zwei dieser Linien wurde außerdem ein erhöhter Gehalt an Chlorogensäure festgestellt, der jedoch nicht mit einem verringerten Gehalt an Kaffeoylglukarsäure korrelierte. Allerdings konnten diese Ergebnisse in der nächsten Generation nicht reproduziert werden. Auch ist aus der Literatur bekannt, dass bei dsRNAi-Ansätzen in Pflanzen transgene Nachkommen häufig große Unterschiede im Grad der Suppression aufweisen. Eine vollständige Suppression ist eher die Ausnahme, weshalb es möglich ist, mit Hilfe von dsRNAi auch Gene zu untersuchen, deren konstitutive Null-Mutation letal ist. Diese charakteristischen Merkmale des PTGS in Pflanzen spricht dafür, dass wesentlich mehr transgene Linien als die getesteten 32 erzeugt und analysiert werden müssten, um eine tatsächlich suppressierte Linie zu erhalten. Die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Linien können auch mit Positionseffekten zusammenhängen. So wurde z. B. für Arabidopsis gezeigt, dass die Chromatinstruktur die Expression des Transgens beeinflussen kann (Nagaya et al. 2005). Wird das RNAi-Konstrukt z. B. im Bereich des Heterochromatins eingebaut, kann es möglicherweise stark an Effektivität verlieren.

Eine Mehrfach-Integration der RNAi-Konstrukte in das Genom der Tomate konnte anhand der Segregation des Selektionsmarkers belegt werden. Die T2-Generation der erzeugten RNAi-Linien waren komplett Basta[®]-resistent. Bei einer Einzelkopie-Insertion würde man eine 3:1-Verteilung von resistenten zu nicht resistenten Pflanzen erwarten. So kommt es zu einer wechselnden Anzahl an Kopien der RNAi-Konstrukte in den nachfolgenden Generationen, was zu unterschiedlichen Ausprägungen des RNAi-Effektes führen kann. In einer Studie über die Effektivität von RNA-Interferenz in Arabidopsis wurde gezeigt, dass

lediglich die Einzelkopie-Insertion einen stabilen und vor allem reproduzierbaren RNAi-Effekt hervorruft, während die Effekte von Mehrfachkopie-Insertionen sehr unterschiedlich ausfielen und nie so effektiv wie eine Einzelkopie-Insertion waren (Kerschen et al. 2004). In einer anderen Gruppe wurde jedoch kürzlich gezeigt, dass Mehrfachkopie-Insertionen teilweise einen besseren Abbau der mRNA bewerkstelligen als Einzelkopie-Insertionen (Wang et al. 2005). Der Nachteil ist allerdings, dass der RNAi-Effekt aus oben genannten Gründen nicht stabil über die Generationen hinweg aufrecht erhalten werden kann. Für zukünftige Arbeiten wäre es empfehlenswert, Linien mit homozygoten Einzelkopie-Insertionen zu finden, da in diesen Linien der RNAi-Effekt stabil über alle Generationen weitergegeben wird. Nur so kann genügend pflanzliches Gewebe von genetisch gleichen Pflanzen erhalten werden, um reproduzierbare Transkript- und Metabolitenanalysen durchzuführen. Dafür müssen zunächst Southern Blot-Analysen an Blättern der ersten transgenen Generation durchgeführt werden. Danach erfolgen Segregationsanalysen der Samen von Linien mit einer möglichen Einzelkopie-Insertion. Zeigt sich hier eine 3:1-Aufspaltung der Nachkommen hinsichtlich der Resistenz auf den Selektionsmarker, handelt es sich tatsächlich um eine Einzelkopie-Insertion. Sind in der T3-Generation sämtliche Individuen gegenüber dem Selektionsmarker resistent, ist die entsprechende Linie homozygot. Dieser Weg ist allerdings sehr zeitaufwändig und konnte im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht realisiert werden.

4.4 Immunlokalisierung der SICGT

Zahlreiche Untersuchungen in den vergangenen Jahren haben gezeigt, dass der Phenylpropanstoffwechsel ein komplexes metabolisches Netzwerk darstellt, in dem die Metaboliten über viele, oft noch nicht näher untersuchte, Stoffwechselwege miteinander vernetzt sind (Vogt 2010). Um dieses Netzwerk zu verstehen und näheres über die biologische Funktion einzelner Enzyme und Metabolite zu erfahren, ist ein fundiertes Wissen über die gewebespezifische und intrazelluläre Lokalisation dieser Enzyme und Metabolite eine wichtige Voraussetzung. Nur so können Aussagen über die Kompartimentierung und damit im Zusammenhang stehende Transportvorgänge getroffen werden. Die Lokalisierung der SICGT sollte daher ebenfalls zur weiteren Aufklärung der Bedeutung dieses Enzyms im Phenylpropanstoffwechsel dienen.

In vorangegangenen Studien konnte die CGT jedoch schon einmal via Immunogold-Elektronenmikroskopie in sieben Tage alten Keimlingen der Tomate lokalisiert werden (Groß 1990). In diesen Analysen wurde das Enzym im Apoplasten aller untersuchten Zelltypen detektiert, wie zum Beispiel in sich entwickelnden Xylem-Elementen, in der verdickten inneren Zellwand von Schließzellen und in der Zellwand von Mesophyllzellen. Auch in einigen cytosolischen Bereichen konnte das Enzym nachgewiesen werden. Es scheint, als würde es durch Vesikel in den Apoplasten sekretiert werden. Allerdings schlug der Nachweis von aktivem Enzym und den Kaffeesäureestern in apoplastischer Waschlösung fehl (Teutschbein et al. 2010). Deshalb sollten im Verlauf der vorliegenden Arbeit erneut Lokalisationsstudien zur SICGT durchgeführt werden.

Computergestützte Analysen der SICGT ließen, wie bereits näher erläutert, vermuten, dass das Enzym als Vorläuferprotein synthetisiert und posttranslational modifiziert wird. Mögliche Modifikationen waren neben der N-Glycosilierung auch das Abspalten der vorausgesagten Signalsequenz.

Leider schlug die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen die SICGT im Rahmen dieser Arbeit fehl. Möglicherweise löst das rekombinante Protein nur eine sehr schwache Immunantwort aus, das heißt, die Immunogenität des Proteins ist nicht stark genug. Als Ursache für eine geringe Immunogenität könnten die fehlenden posttranslationalen Modifikationen des rekombinanten, in *E. coli* erzeugten Proteins sein. So ist zum Beispiel bekannt, dass glycosylierte Proteine häufig stärker immunogen wirken als nicht-glycosylierte Proteine. Ob auch weitere posttranslationale Modifikationen Einfluss auf die Immunogenität haben, ist bisher unklar (Jelkmann 2008). Ein wichtiger Punkt bei der Effektivität eines Antigens ist allerdings die Anzahl sogenannter Epitope, das sind antigene Strukturelemente. Die Anzahl dieser Epitope in einem Protein hängt nicht nur von der Aminosäuresequenz, sondern auch von seiner dreidimensionalen Faltung ab. So können Epitope aus verschiedenen im Raum nah bei einander liegenden Aminosäureresten bestehen, die aber in der Aminosäuresequenz eigentlich weit voneinander entfernt sind. Native Proteine besitzen kontinuierliche und diskontinuierliche Epitope, während denaturierte Proteine lediglich kontinuierliche Epitope aufweisen. Zur Immunisierung des Kaninchens wurde denaturiertes SICGT-Protein verwendet, was vermutlich eine geringere Antigenwirkung als natives Protein besitzt.

Als Ausweichstrategie wurde die Lokalisation in *N. benthamiana* mit Hilfe transienter Transformation gewählt. Verwendet wurde dafür das Überexpressionskonstrukt der SICGT

mit C-terminalem His-tag, da ein Nachweis des Fusionsproteins mit einem gegen den His-tag gerichteten Antikörper möglich sein sollte. Nach Reinigung des Enzyms mittels Metallaffinitätschromatografie aus dem Proteinrohextrakt transformierter Tabakblätter ließ sich das Enzym jedoch im Western Blot nicht nachweisen, während die Aktivität des Enzyms mittels eines Aktivitätsassays und anschließender HPLC-Analysen eindeutig nachweisbar war. Auch in mikroskopischen Untersuchungen der transgenen Tabakblätter konnte keine Immunmarkierung nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache könnte daran liegen, dass die CGT in Tabak zwar eine sehr hohe Aktivität aufweist, jedoch bisher ungeklärt ist, in welchen Mengen das Enzym tatsächlich vorliegt. Möglicherweise ist die Enzymkonzentration zu gering für eine Lokalisierung. Dafür spricht auch die geringe Proteinmenge, die nach Reinigung des Enzyms aus den Tabakblättern erhalten wurde (Daten nicht gezeigt). Auch ist nicht sicher, dass das Enzym in Tabakblättern auch tatsächlich an der gleichen Stelle lokalisiert ist wie in Tomate, da das Transitpeptid nicht spezifisch für *N. benthamiana* ist.

Nun stellt sich natürlich die Frage nach der Bedeutung der vermuteten apoplastischen Lokalisierung der SICGT für die Pflanze. Der Apoplast stellt nicht nur eine mechanische Barriere gegenüber Pathogenangriffen dar, sondern spielt auch in der chemischen Abwehr von Pflanzenpathogenen eine wichtige Rolle, wie zum Beispiel durch das Vorkommen von Zellwand-verknüpften Phenolen (Franke et al. 1998) und PR- (*pathogenesis related*) Proteinen (Hückelhoven 2007; Floerl et al. 2008). Die Bildung von PR-Proteinen ist nicht Pathogen-spezifisch, sondern abhängig von der Reaktion der Pflanze. In resistenten Pflanzen führt die Akkumulation von PR-Proteinen an der Infektionsstelle zu einer hypersensitiven Reaktion und damit zum Absterben der befallenen Zellen. Auch haben viele PR-Proteine eine antifungale Wirkung. Auch proteolytisch aktive und Proteinase-inhibierende PR-Proteine sind bekannt (van Loon 1985; Stintzi et al. 1993). Des Weiteren wurde bereits ein GDSL-Enzym als Zellwand-sekretierte Lipase beschrieben, welches eine antimikrobielle Funktion besitzt, durch welche Pilzsporen direkt zerstört werden (Oh, Park et al. 2005).

Setzt man eine kontinuierliche Versorgung mit Chlorogensäure und Glukarsäure voraus, so sollte die Anwesenheit der SICGT im Apoplasten der Blätter zu einer extrazellulären Akkumulation von Kaffeoylglukarsäure führen. Da *S. lycopersicum* im Keimblattstadium sehr anfällig gegenüber fungalen Pathogenen der Gattungen *Phytium*, *Phytophthora* und auch gegen *Rhizoctonia solani* ist, wäre eine Produktion vermutlich antipathogen

wirkender Substanzen, wie z. B. Kaffeoyleglukarsäure, und die Lagerung dieser Produkte im Apoplasten anfälliger Gewebe und Organe sinnvoll. Allerdings ist bisher unklar, ob Kaffeoyleglukarsäure allein oder in Kombination mit Chlorogensäure tatsächlich als bioaktives Agens fungieren kann. Die Wirkung von bestimmten Sekundärstoffen, insbesondere phenolische Verbindungen, Glucosinolate, Alkaloide und Terpene gegen Herbivoren (Elliger et al. 1981; Bennett und Wallsgrave 1994; Leiss et al. 2009), Bakterien und Pilze (Ravn und Brimer 1988; Lyons et al. 1990; Lizzi et al. 1995) oder gegen Viren (Cheminat et al. 1988) wurde bereits gezeigt.

Für einige Sekundärmetabolite ist bekannt, dass ihre inaktiven Vorstufen, z. B. biologisch inaktive cyanogene Glycoside, Senfölglycoside sowie Glycoside der *O*-Cumarsäure gespeichert und bei Bedarf in toxische Verbindungen umgewandelt werden. Bei Verletzung der Zellen führt der Kontakt mit cytosolischen bzw. extrazellulären Glucosidasen zur Bildung von reaktiven Verbindungen wie Blausäure, Isothiocyanat, Nitril, Thiocyanat und Cumarin (Oba et al. 1981; Matile 1984; Morrissey und Osbourn 1999). Angesichts dieser vielfältigen ökologisch bedeutsamen Effekte pflanzlicher Sekundärstoffe sollte man aber nicht außer Acht lassen, dass die Akkumulation des Metaboliten Kaffeoyleglukarsäure eventuell auch eine Möglichkeit zur unbedenklichen Speicherung von Stoffwechselendprodukten darstellt. Die Lokalisation im Apoplasten würde dann eventuell störende Interaktionen mit intrazellulären Prozessen effektiv verhindern.

4.5 Weiterführende Arbeiten

In den vorangegangenen Abschnitten wurden einige Ansätze für weiterführende Experimente bereits angedeutet. Im Mittelpunkt sollten dabei Arbeiten zu den Struktur-Funktionsbeziehungen der SICGT und der Ableitung des kinetischen Mechanismus' der Acyltransfer-Reaktion stehen.

Für weitere Struktur- und Funktionsanalysen der SICGT ist die Erhöhung der Ausbeute an enzymatisch aktivem Protein in einem heterologen Expressionssystem anzustreben. Die Reinigung der SICGT aus Tomate oder aus transformierten Tabakblättern ist sehr aufwändig und führt meist nur zu einer sehr geringen Ausbeute an aktivem Enzym. Eine Möglichkeit wäre die Optimierung des Hefeexpressionssystems, z. B. durch Anpassung

der SICGT-Nukleotidsequenz an die Erfordernisse des Translationsapparates der Hefezellen (Codonpräferenz, Signalpeptid).

Auch die Lokalisation der SICGT im Apoplasten der Keimblätter bedarf einer Wiederholung und weiterer Aufklärung. Sollte die Herstellung eines Antikörpers problematisch bleiben, bietet sich hier die Fusion des Enzyms mit Fluoreszenzfarbstoffen, z.B. GFP, an. Auch die Funktion der SICGT bzw. des katalysierten Reaktionsweges im Apoplasten sollte mit Hilfe von biotischen Interaktionen näher untersucht werden. Analysen der Wechselwirkungen mit Herbivoren, Bakterien und Pilzen könnten nicht nur mit Wildtyp-Pflanzen durchgeführt werden, sondern auch in Kombination mit den Überexpressionslinien der *SICGT*, die unter normalen Anzuchtbedingungen kaum Änderung im Phenylpropanstoffwechsel zeigen.

Eine Wiederholung der RNAi-Ansätze zur weiteren Aufklärung der biologischen Funktion der SICGT wäre ebenfalls denkbar. Hier wäre es sinnvoll, über die Konstruktion einer neuen Suppressionskassette nachzudenken, die durch Verwendung der 5'- und 3'-Region und eines *SICGT*-Introns als Spacer ausschließlich aus homologen Sequenzen besteht und durch einen induzierbaren Promotor kontrolliert wird. Auch kann durch neue Klonierungstechniken, wie z. B. das sogenannte Golden Gate Cloning das Assembling der dsRNAi-Kassetten sehr viel effizienter durchgeführt werden als die verwendete, auf einzelnen Restriktions-Ligationsansätzen basierende Klonierungsstrategie mit zahlreichen Subklonierungen (Engler et al. 2008; Engler et al. 2009). Allerdings stellt sich die Frage, wie realistisch die zu erwartenden Effekte bei der Supression eines ohnehin recht schwach exprimierten Genes sind.

Da im Rahmen dieser Arbeit nur die Identifizierung eines Promotorteilbereiches gelang, sollten diese Analysen ebenfalls ausgeweitet werden. Bei erfolgreicher Identifizierung des gesamten Promotorbereiches können gezielte Deletionen von Promotorbereichen zur Kartierung von regulatorisch aktiven *cis*-Elementen dienen und zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der SICGT-Expression beitragen.

5. Zusammenfassung

Aus Tomatenkeimlingen wurde ein Enzym isoliert, welches die Synthese von Kaffeoyleglukar- und -galaktarsäure als Haupt- und Nebenprodukt katalysiert. Dieses Enzym verwendet weder CoA-Thioester noch 1-O-Glucoseester, sondern Chlorogensäure als Acyldonor und wurde als Chlorogensäure:Glukarsäure-Kaffeoyletransferase (CGT) klassifiziert. Aufgrund der Sequenzidentitäten zu GDSL-Lipasen konnte die SICGT als Vertreter der SGNH-Hydrolase-Superfamilie klassifiziert werden.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Klonierung, Charakterisierung und Lokalisierung der SICGT, um erste Einblicke in die Funktion und Regulation sowie Evolution dieser ungewöhnlichen Acyltransferase zu gewinnen. Folgende Resultate konnten erzielt werden:

- Ausgehend von vier Peptiden des gereinigten Enzyms konnte eine cDNA-Sequenz mit einem durchgängigen Leserahmen von 1143 bp und einem abgeleiteten Protein von 380 Aminosäuren isoliert werden. Computergestützte Analysen sagten ein N-terminales Signalpeptid für den ER-Import und eine anschließende Sekretion sowie mehrere N-Glycosilierungsstellen voraus.
- Die Funktionalität von *SICGT* wurde durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* und *N. benthamiana* bewiesen. Es wurde des Weiteren gezeigt, dass eine C-terminale Fusion des Proteins mit einer 6xHistidinsequenz zu einem Aktivitätsverlust von ca. 70 % führt.
- Analysen der SICGT-Proteinsequenz ergaben, dass das Protein als GDSL-Lipase-ähnliches Protein klassifiziert werden kann. Sequenzvergleiche sagten für das katalytische Zentrum ein *charge relay*-System aus Serin27, Histidin331 und Aspartat162 oder Aspartat328 des reifen Proteins voraus. Inhibition der Enzymaktivität durch PMSF bestätigten den Einfluss eines Serylrestes auf die Katalysereaktion. Allerdings wiesen Mutagenesestudien darauf hin, dass die von den GDSL-Lipasen abgeleitete putative katalytische Triade nicht als katalytisches Zentrum in die Acyltransferase-Reaktion der CGT involviert ist. Es scheint, als würde die SICGT ein bisher unbekanntes katalytisches Motiv für die spezifische Chlorogensäure-abhängige Kaffeoyletransferase-Reaktion nutzen. Auch konnte

experimentell der Verlust der hydrolytischen Aktivität der CGT nachgewiesen werden, was ebenfalls darauf hin deutet, dass sich dieses Enzym zwar aus den GDSL-Lipasen des Primärstoffwechsels abgeleitet hat, sich jedoch im Laufen der Evolution hin zu einer spezifischen Acyltransferase entwickelt hat.

- Durch Southern Blot-Analysen gelang es, das *SICGT*-Gen als unikales Gen im Genom der Tomate zu identifizieren. Mit Hilfe von Genome Walking gelang zudem die Identifizierung einer putativen Promotorsequenz mit einer Größe von 905 bp. Sequenzanalysen zeigten, dass in dieser Sequenz eine Vielzahl von potenziellen *cis*-regulatorischen Elementen vorhergesagt werden können. Aktivitäts- und Expressionsanalysen zeigten eine sehr hohe Aktivität der SICGT in Kotyledonen sich entwickelnder Keimlinge und in den Primärblättern. Die Transkriptabundanzen korrelieren mit den für die SICGT-Aktivität ermittelten Werten. Die Aktivität der SICGT konnte auch in einigen anderen Organen der Tomate nachgewiesen werden. Auch hier korrelieren die Transkriptabundanzen größtenteils mit den ermittelten Enzymaktivitäten, nur für junge und adulte Laubblätter und Blüten ergaben sich Abweichungen.

Die weiterhin offene Frage nach der biologischen Rolle der SICGT und ihrer Funktion im apoplastischen Bereich der Mesophyllzellen in der Reaktion auf biotische und abiotische Umwelteinflüsse sollte durch weitere Analysen geklärt werden. Auch sollten umfangreichere Untersuchungen zu den Struktur-Funktionsbeziehungen der SICGT erfolgen.

6. Literaturverzeichnis

Akoh, C. C., G.-C. Lee, Y.-C. Liaw, T.-H. Huang and J.-F. Shaw (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research* **43**(6): 534-552.

Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadrinab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C. C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D. E. Carter, T. Marchand, E. Risseuw, D. Brogden, A. Zeko, W. L. Crosby, C. C. Berry and J. R. Ecker (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**(5633): 653-657.

Arif, S. A. M., R. G. Hamilton, F. Yusof, N. P. Chew, Y. H. Loke, S. Nimkar, J. J. Beintema and H. Y. Yeang (2004). Isolation and characterization of the early nodule-specific protein homologue (Hev b 13), an allergenic lipolytic esterase from *Hevea brasiliensis latex*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(23): 23933-23941.

Bais, H. P., R. Vepachedu, S. Gilroy, R. M. Callaway and J. M. Vivanco (2003). Allelopathy and Exotic Plant Invasion: From Molecules and Genes to Species Interactions *Science* **301**(5638): 1377-1380.

Bate, N. and D. Twell (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Molecular Biology* **37**(5): 859-869.

Baumert, A., C. Milkowski, J. Schmidt, M. Nimtz, V. Wray and D. Strack (2005). Formation of a complex pattern of sinapate esters in *Brassica napus* seeds, catalyzed by enzymes of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase family. *Phytochemistry* **66**(11): 1334-1345.

Bennett, R. N. and R. M. Wallsgrave (1994). Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms. *New Phytologist* **127**(4): 617-633.

Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental, systems. *Journal of Bacteriology* **186**(3): 595-600.

Bharti, A. K. and J. P. Khurana (1997). Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. *Photochemistry and Photobiology* **65**(5): 765-776.

Bhuiyan, N. H., G. Selvaraj, Y. Wei and J. King (2009). Gene expression profiling and silencing reveal that monoglignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J. Exp. Bot.* **60**(2): 509-521.

- Bitter, G. A., K. K. Chen, A. R. Banks and P. H. Lai** (1992). Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by alpha-factor gene fusions. *Biotechnology* **24**: 325-9.
- Bokern, M., S. Heuer and D. Strack** (1991a). Hydroxycinnamic acid transferases in the biosynthesis of acylated betacyanins: purification and characterization from cell cultures of *Chenopodium rubrum* and occurrence in some other members of the Caryophyllales. *Bot. Acta* **105**: 146-151.
- Bokern, M. and D. Strack** (1988). Synthesis of hydroxycinnamic acid esters of betacyanins via 1-O-acylglucosides of hydroxycinnamic acids by protein preparations from cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* and petals of *Lampranthus sociorum*. *Planta* **174**: 101-105.
- Bokern, M., V. Wray and D. Strack** (1991b). Accumulation of Phenolic-Acid Conjugates and Betacyanins, and Changes in the Activities of Enzymes Involved in Feruloylglucose Metabolism in Cell-Suspension Cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Planta* **184**(2): 261-270.
- Booij-James, I. S., S. K. Dube, M. A. K. Jansen, M. Edelman and A. K. Mattoo** (2000). Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in arabidopsis mutants altered in phenolic metabolism. *Plant Physiology* **124**(3): 1275-1283.
- Boudet, A. M.** (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **68**(22-24): 2722-2735.
- Brick, D. J., M. J. Brumlik, J. T. Buckley, J. X. Cao, P. C. Davies, S. Misra, T. J. Tranbarger and C. Upton** (1995). A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize. *FEBS Letters* **377**(3): 475-480.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem and R. L. Jones** (2000). Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland*.
- Chakravarthy, S., R. P. Tuori, M. D. D'Ascenzo, P. R. Fobert, C. Despres and G. B. Martin** (2003). The Tomato Transcription Factor Pti4 Regulates Defense-Related Gene Expression via GCC Box and Non-GCC Box cis Elements. *Plant Cell* **15**(12): 3033-3050.
- Chang, A., M.-H. Lim, S.-W. Lee, E. J. Robb and R. N. Nazar** (2008). Tomato Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family, Highly Redundant but Strongly Underutilized. *Journal of Biological Chemistry* **283** (48): 33591-33601
- Chang, R.-C., J. C. Chen and J.-F. Shaw** (1996). Site-Directed Mutagenesis of a Novel Serine Arylesterase from *Vibrio mimicus* Identifies Residues Essential for Catalysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **221**(2): 477-483.
- Chapple, C., T. Vogt, B. E. Ellis and C. R. Somerville** (1992). An Arabidopsis Mutant Defective in the General Phenylpropanoid Pathway. *Plant Cell* **4**(11): 1413-1424.

- Cheminat, A., R. Zawatzky, H. Becker and R. Brouillard** (1988). Caffeoyl conjugates from Echinacea species: Structures and biological activity. *Phytochemistry* **27**(9): 2787-2794.
- Clauß, K., A. Baumert, M. Nimtz, C. Milkowski and D. Strack** (2008). Role of a GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in Brassicaceae. *The Plant Journal* **53**(5): 802-813.
- Croteau, R., T. Kutchan and N. Lewis** (2000). Natural products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, ASPP.* (ed. Buchanan): 1250-1341.
- Cummins, I. and R. Edwards** (2004). Purification and cloning of an esterase from the weed black-grass *Alopecurus myosuroides*, which bioactivates aryloxyphenoxypropionate herbicides. *The Plant Journal* **39**(6): 894-904.
- Dahlbender, B. and D. Strack** (1986). Purification and properties of 1-(hydroxycinnamoyl)-glucose:1-(hydroxycinnamoyl)-glucose hydroxycinnamoyltransferase from radish seedlings. *Phytochemistry* **25**(5): 1043-1046.
- Derewenda, Z. S.** (1994). Structure and Function of Lipases. *Advances in Protein Chemistry, Vol 45* **45**: 1-52.
- Dong, H. J., L. Nilsson and C. G. Kurland** (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *Journal of Molecular Biology* **260**(5): 649-663.
- Dudareva, N. and E. Pichersky** (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Current Opinion in Biotechnology / Food biotechnology / Plant biotechnology* **19**(2): 181-189.
- Elliger, C. A., R. E. Lundin and H. W. F.** (1981). Caffeoyl esters of glucaric acid in *Lycopersicon esculentum* leaves. *Phytochemistry* **20**(5): 1133-1134.
- Engler, C., R. Gruetzner, R. Kandzia and S. Marillonnet** (2009). Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type II Restriction Enzymes. *Plos One* **4**(5).
- Engler, C., R. Kandzia and S. Marillonnet** (2008). A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *Plos One* **3**(11).
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Floerl, S., C. Druebert, A. Majcherczyk, P. Karlovsky, U. Kues and A. Polle** (2008). Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology* **8**(1): 129.

- Franke, R., S. C. Fry and H. Kauss** (1998). Low-molecular-weight precursors for defense-related cell wall hydroxycinnamoyl esters in elicited parsley suspension cultures. *Plant Cell Reports* **17**(5): 379-383.
- Franke, R., M. R. Hemm, J. W. Denault, M. O. Ruegger, J. M. Humphreys and C. Chapple** (2002a). Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis. *Plant Journal* **30**(1): 47-59.
- Franke, R., J. M. Humphreys, M. R. Hemm, J. W. Denault, M. O. Ruegger, J. C. Cusumano and C. Chapple** (2002b). The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal* **30**(1): 33-45.
- Fraser, C. M., M. G. Thompson, A. M. Shirley, J. Ralph, J. A. Schoenherr, T. Sinlapadech, M. C. Hall and C. Chapple** (2007). Related Arabidopsis Serine Carboxypeptidase-Like Sinapoylglucose Acyltransferases Display Distinct But Overlapping Substrate Specificities. *Plant Physiol.* **144**(4): 1986-1999.
- Fry, S. C.** (1982). Phenolic Components of the Primary-Cell Wall - Feruloylated Disaccharides of D-Galactose and L-Arabinose from Spinach Polysaccharide. *Biochemical Journal* **203**(2): 493-504.
- Fry, S. C.** (1986). Cross-Linking of Matrix Polymers in the Growing Cell-Walls of Angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **37**: 165-186.
- Grand, C.** (1984). Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P-450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Letters* **169**(1): 7-11.
- Gräwe, W., P. Bachhuber, H.-P. Mock and D. Strack** (1992). Purification and characterization of sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase from *Raphanus sativus* L. *Planta*, Springer Berlin / Heidelberg. **187**: 236-241.
- Gross, G. G. and W. Kreiten** (1975). Reduction of Coenzyme a Thioesters of Cinnamic Acids with an Enzyme Preparation from Lignifying Tissue of Forsythia. *FEBS Letters* **54**(2): 259-262.
- Groß, W.** (1990). Charakterisierung und Lokalisation der Chlorogensäure:Glucarsäure-Caffeoyltransferase in *Lycopersicon esculentum*-Blättern.
- Hahlbrock, K. and D. Scheel** (1989). Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**(1): 347-369.
- Hamberger, B., M. Ellis, M. Friedmann, C. de Azevedo Souza, B. Barbazuk and C. J. Douglas** (2007). Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the Populus lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families. *Canadian Journal of Botany* **85**: 1182-1201.

- Hamberger, B. r. and K. Hahlbrock** (2004). The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(7): 2209-2214.
- Hamilton, R., C. K. Watanabe and H. A. Deboer** (1987). Compilation and Comparison of the Sequence Context around the Aug Startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* Messenger-Rnas. *Nucleic Acids Research* **15**(8): 3581-3593.
- Hartl, F. U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**(6583): 571-580.
- Hartley, R. D. and C. W. Ford** (1989). Phenolic Constituents of Plant-Cell Walls and Wall Biodegradability. *Plant Cell Wall Polymers* **399**: 137-145.
- Hartmann, T.** (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**(1): 177-188.
- Hartmann, T.** (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**(22-24): 2831-2846.
- Hartmann, T. and D. Ober** (2003). Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel: Biologische Notwendigkeit und Pharmazeutischer Nutzen. *Carolo-Wilhelmina: Forschungsmagazin der Technischen Universität Braunschweig* **1**: 26-32.
- Hausmann, L. and R. Töpfer** (1999). Entwicklung von Plasmid-Vektoren. *Bioengineering für Rapsorten nach Maß. Vorträge für Pflanzenzüchtung*: 155-173.
- Heimann, W., K. Herrmann and G. Feucht** (1971). Über das Vorkommen von Hydroxyzimtsäuren in Gemüse. *Z. für Lebensmittel-Untersuch. u. Forschung* **145**: 199-205.
- Herrmann, K. M.** (1995). The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. *Plant Physiol.* **107**(1): 7-12.
- Hoffmann, L., S. p. Maury, F. o. Martz, P. Geoffroy and M. Legrand** (2003). Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **278**(1): 95-103.
- Hückelhoven, R.** (2007). Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101-127.
- Humphreys, J. M. and C. Chapple** (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(3): 224-229.
- Hutchinson, M. H., G. Morreale, A. P. J. Middelberg and H. A. Chase** (2006). Production of enzymatically active ketosteroid isomerase following insoluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **95**(4): 724-733.

- Hutzler, P., R. Fischbach, W. Heller, T. P. Jungblut, S. Reuber, R. Schmitz, M. Veit, G. Weissenbock and J. P. Schnitzler** (1998). Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* **49**(323): 953-965.
- Iiyama, K., T. B. T. Lam and B. A. Stone** (1994a). Covalent Cross-Links in the Cell-Wall. *Plant Physiology* **104**(2): 315-320.
- Ishii, T.** (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* **127**(2): 111-127.
- Jelkmann, W.** (2008). Immunogenität rekombinanter Therapeutika. *Rekombinante Arzneimittel - medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie*, Springer Verlag: 63-74.
- Junker, B. H., J. Lonien, L. E. Heady, A. Rogers and J. Schwender** (2007). Parallel determination of enzyme activities and in vivo fluxes in *Brassica napus* embryos grown on organic or inorganic nitrogen source. *Phytochemistry* **68**(16-18): 2232-2242.
- Kamsteeg, J., J. Van Brederode, C. Hommels and G. Van Nigtevecht** (1980). Identification, properties and genetic control of hydroxycinnamoyl-coenzyme A:anthocyanidin 3-rhamnosyl(1-6)glucoside 4'-hydroxycinnamoyl transferase isolated from petals of *Silene dioica*. *Biochem Physiol Pflanzen* **175**: 403-411.
- Kane, J. F.** (1995). Effects of Rare Codon Clusters on High-Level Expression of Heterologous Proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **6**(5): 494-500.
- Kapila, J., R. De Rycke, M. Van Montagu and G. Angenon** (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**: 101-108.
- Kerschen, A., C. A. Napoli, R. A. Jorgensen and A. E. Muller** (2004). Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Letters* **566**(1-3): 223-228.
- Kesy, J. M. and R. S. Bandurski** (1990). Partial Purification and Characterization of Indol-3-Ylacetylglucosemyo-Inositol Indol-3-Ylacetyltransferase (Indoleacetic Acid-Inositol Synthase). *Plant Physiol.* **94**(4): 1598-1604.
- Kim, K. K., K. Y. Hwang, K. D. Choi, J. H. Kang, O. J. Yoo and S. W. Suh** (1993). Crystallization and Preliminary-X-Ray Crystallographic Analysis of Arylesterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Proteins-Structure Function and Genetics* **15**(2): 213-215.
- Kojima, M. and T. Kondo** (1985). An Enzyme in Sweet Potato Root which Catalyzes the Conversion of Chlorogenic Acid, 3-Caffeoylquinic Acid, to Isochlorogenic Acid, 3,5-Dicaffeoylquinic Acid. *Agric Biol Chem* **49**: 2467-2469.
- Kojima, M. and I. Uritani** (1972). Elucidation of the structure of a possible intermediate in chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato root tissue. *Plant Cell Physiology* **13**: 1075-1084.

- Koukol, J. and E. E. Conn** (1961). Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants 4. Purification and Properties of Phenylalanine Deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry* **236**(10): 2692-2698.
- Kozak, M.** (1983). Comparison of Initiation of Protein-Synthesis in Procaryotes, Eukaryotes, and Organelles. *Microbiological Reviews* **47**(1): 1-45.
- La Camera, S., G. Gouzerh, S. Dhondt, L. Hoffmann, B. Fritig, M. Legrand and T. Heitz** (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews* **198**: 267-284.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *227*(5259): 680-685.
- Lamb, C.** (1977). trans-Cinnamic acid as a mediator of the light-stimulated increase in hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase. *FEBS Letters* **75**(1): 37-40.
- Landry, L. G., C. C. S. Chapple and R. L. Last** (1995). Arabidopsis Mutants Lacking Phenolic Sunscreens Exhibit Enhanced Ultraviolet-B Injury and Oxidative Damage. *Plant Physiology* **109**(4): 1159-1166.
- Lee, D. S., B. K. Kim, S. J. Kwon, H. C. Jin and O. K. Park** (2009). Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **379**(4): 1038-1042.
- Lee, Y. L., J. C. Chen and J. F. Shaw** (1997). The thioesterase I of *Escherichia coli* has arylesterase activity and shows stereospecificity for protease substrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **231**(2): 452-456.
- Lehfeldt, C., A. M. Shirley, K. Meyer, M. O. Ruegger, J. C. Cusumano, P. V. Viitanen, D. Strack and C. Chapple** (2000). Cloning of the SNG1 gene of arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12**(8): 1295-1306.
- Leiss, K. A., F. Maltese, Y. H. Choi, R. Verpoorte and P. G. L. Klinkhamer** (2009). Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in Chrysanthemum. *Plant Physiology* **150**(3): 1567-1575.
- Li, A. X. and J. C. Steffens** (2000). An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(12): 6902-6907.
- Li, J., U. Derewenda, Z. Dauter, S. Smith and Z. S. Derewenda** (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* thioesterase II, a homolog of the human Nef binding enzyme. *Nature Structural Biology* **7**(7): 555-559.
- Li, J. Y., T. M. Oulee, R. Raba, R. G. Amundson and R. L. Last** (1993). Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to Uv-B Irradiation. *Plant Cell* **5**(2): 171-179.

- Lifton, R. P., M. L. Goldberg, R. W. Karp and D. S. Hogness** (1978). The Organization of the Histone Genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and Evolutionary Implications. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **42**: 1047-1051.
- Lillo, C., U. S. Lea and P. Ruoff** (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell and Environment* **31**(5): 587-601.
- Lindl, T., Kreuzale.F and Hahlbroc.K** (1973). Synthesis of Para-Coumaroyl Coenzyme a with a Partially Purified Para-Coumarate - Coa Ligase from Cell Suspension Cultures of Soybean (*Glycine max*). *Biochimica Et Biophysica Acta* **302**(2): 457-464.
- Ling, H., J. Zhao, K. Zuo, C. Qiu, H. Yao, J. Qin, X. Sun and K. Tang** (2006). Isolation and Expression Analysis of a GDSL-like Lipase Gene from *Brassica napus* L. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **39**(3): 297-303.
- Lizzi, Y., J. P. Roggero and P. J. Coulomb** (1995). Behaviour of the phenolic compounds on *Capsicum annuum* leaves infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **143**(10): 619-627.
- Lo, Y.-C., S.-C. Lin, J.-F. Shaw and Y.-C. Liaw** (2003). Crystal Structure of *Escherichia coli* Thioesterase I/Protease I/Lysophospholipase L1: Consensus Sequence Blocks Constitute the Catalytic Center of SGNH-hydrolases through a Conserved Hydrogen Bond Network. *Journal of Molecular Biology* **330**(3): 539-551.
- Lo, Y. C., Y. L. Lee, J. F. Shaw and Y. C. Liaw** (2000). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of thioesterase I from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **56**: 756-757.
- Lyons, P., K. Wood and R. Nicholson** (1990). Caffeoyl ester accumulation in corn leaves inoculated with fungal pathogens. *Phytochemistry* **29**(1): 97-101.
- Markham, K. R. and T. J. Mabry** (1975). Mass spectrometry of flavonoids. *The Flavonoids, London: Chapman and Hall*: 78-126.
- Mathew, S. and T. E. Abraham** (2004). Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **24**(2-3): 59-83.
- Matile, P.** (1984). Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. *Naturwissenschaften* **71**(1): 18-24.
- Mayfield, J. A., A. Fiebig, S. E. Johnstone and D. Preuss** (2001). Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science* **292**(5526): 2482-2485.
- McBride, K. E. and K. R. Summerfelt** (1990). Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* **14**(2): 269-276.
- Meissner, D., A. Albert, C. Bottcher, D. Strack and C. Milkowski** (2008). The role of UDP-glucose:hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **228**(4): 663-674.

- Milkowski, C., A. Baumert, D. Schmidt, L. Nehlin and D. Strack** (2004). Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *The Plant Journal* **38**(1): 80-92.
- Milkowski, C., A. Baumert and D. Strack** (2000). Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. *Planta* **211**(6): 883-886.
- Mock, H.-P. and D. Strack** (1993). Energetics of the uridine 5'-diphosphoglucose: Hydroxycinnamic acid acyl-glucosyltransferase reaction. *Phytochemistry* **32**(3): 575-579.
- Molgaard, A., S. Kauppinen and S. Larsen** (2000). Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure with Folding & Design* **8**(4): 373-383.
- Morrissey, J. P. and A. E. Osbourn** (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**(3): 708-+.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich** (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**: 263-273.
- Nagaya, S., K. Kato, Y. Ninomiya, R. Horie, M. Sekine, K. Yoshida and A. Shinmyo** (2005). Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **46**(3): 438-444.
- Nair, R. B., K. L. Bastress, M. O. Ruegger, J. W. Denault and C. Chapple** (2004). The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **16**(2): 544-554.
- Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans. *Plant Cell* **2**(4): 279-289.
- Niemetz, R. and G. G. Gross** (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* **66**(17): 2001-2011.
- Niggeweg, R., A. J. Michael and C. Martin** (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. **22**(6): 746-754.
- Nurmann, G. and D. Strack** (1981). Formation of 1-sinapoylglucose from free sinapic acid and UDP-glucose by a cell-free system from *Raphanus sativus* seedlings. *Z für Pflanzenphysiol* **102**: 11-17.
- Oba, K., E. E. Conn, H. Canut and A. M. Boudet** (1981). Sub-Cellular Localization of 2-(Beta-D-Glucosyloxy)-Cinnamic Acids and the Related Beta-Glucosidase in Leaves of *Melilotus alba* Desr. *Plant Physiology* **68**(6): 1359-1363.

Oh, I. S., A. R. Park, M. S. Bae, S. J. Kwon, Y. S. Kim, J. E. Lee, N. Y. Kang, S. M. Lee, H. Cheong and O. K. Park (2005). Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell* **17**(10): 2832-2847.

Ossowski, S., R. Schwab and D. Weigel (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* **53**(4): 674-690.

Outchkourov, N. S., J. Peters, J. de Jong, W. Rademakers and M. A. Jongsma (2003). The promoter-terminator of chrysanthemum rbcS1 directs very high expression levels in plants. *Planta* **216**(6): 1003-1012.

Pakusch, A. E., R. E. Kneusel and U. Matern (1989). S-Adenosyl-L-Methionine - Trans-Caffeoyl-Coenzyme-a 3-O-Methyltransferase from Elicitor-Treated Parsley Cell-Suspension Cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **271**(2): 488-494.

Petersen, M., Y. Abdullah, J. Benner, D. Eberle, K. Gehlen, S. Hücherig, V. Janiak, K. H. Kim, M. Sander, C. Weitzel and S. Wolters (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* **70**(15-16): 1663-1679.

Pfaffl, M. W. and M. Hageleit (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol. Lett* **23**: 275-282.

Philippe, S., O. Tranquet, J. P. Utile, L. Saulnier and F. Guillon (2007). Investigation of ferulate deposition in endosperm cell walls of mature and developing wheat grains by using a polyclonal antibody. *Planta* **225**(5): 1287-1299.

Piechulla, B., N. Merforth and B. Rudolph (1998). Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology* **38**(4): 655-662.

Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. L. Deprez and A. F. M. Moorman (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**(1): 62-66.

Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. *Springer Press, Heidelberg, Deutschland*.

Ravn, H. and L. Brimer (1988). Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subs. *major*. **27**(11): 3433-3437.

Richter, G. (1998). Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. *Thieme Verlag, Stuttgart*.

Ritter, H. and G. E. Schulz (2004). Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell* **16**(12): 3426-3436.

Rhodes, M. J. C. and Woollorton, L.S.C. (1976). The enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to p-coumarylquinic and chlorogenic acids in tomato fruits. *Phytochem.* **15**: 947-951

- Rommens, C. M., C. M. Richael, H. Yan, D. A. Navarre, J. Ye, M. Krucker and K. Swords** (2008). Engineered native pathways for high kaempferol and caffeoylquinic acid production in potato. *Plant Biotechnol J* **6**(9): 870-86.
- Rosler, J., F. Krekel, N. Amrhein and J. Schmid** (1997). Maize Phenylalanine Ammonia-Lyase Has Tyrosine Ammonia-Lyase Activity. *Plant Physiol.* **113**(1): 175-179.
- Ruhland, C. T., F. S. Xiong, W. D. Clark and T. A. Day** (2005). The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochemistry and Photobiology* **81**(5): 1086-1093.
- Ruiz, C., S. Falcocchio, E. Xoxi, F. I. Javier Pastor, P. Diaz and L. Saso** (2004). Activation and inhibition of *Candida rugosa* and Bacillus-related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1672**(3): 184-191.
- Ruppert, M., J. r. Woll, A. Giritch, E. Genady, X. Ma and J. Stöckigt** (2005). Functional expression of an ajmaline pathway-specific esterase from Rauvolfia in a novel plant-virus expression system. *Planta* **222**(5): 888-898.
- Russell, D. W.** (1971). The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants *Journal of Biological Chemistry* **246**(12): 3870-3878.
- Russell, D. W. and E. E. Conn** (1967). The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings [isolation, activity, cofactor requirements]. *Arch Biochem Biophys* **122**((1)): 256-258.
- Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis** (1989). Molecular Cloning-a Laboratory Manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Sasaki, T., T. Matsumoto, K. Yamamoto, K. Sakata, T. Baba, Y. Katayose, J. Wu, Y. Niimura, Z. Cheng, Y. Nagamura, B. A. Antonio, H. Kanamori, S. Hosokawa, M. Masukawa, K. Arikawa, Y. Chiden, M. Hayashi, M. Okamoto, T. Ando, H. Aoki, K. Arita, M. Hamada, C. Harada, S. Hijishita, M. Honda, Y. Ichikawa, A. Idonuma, M. Iijima, M. Ikeda, M. Ikeno, S. Ito, T. Ito, Y. Ito, Y. Ito, A. Iwabuchi, K. Kamiya, W. Karasawa, S. Katagiri, A. Kikuta, N. Kobayashi, I. Kono, K. Machita, T. Maehara, H. Mizuno, T. Mizubayashi, Y. Mukai, H. Nagasaki, M. Nakashima, Y. Nakama, Y. Nakamichi, M. Nakamura, N. Namiki, M. Negishi, I. Ohta, N. Ono, S. Saji, K. Sakai, M. Shibata, T. Shimokawa, A. Shomura, J. Song, Y. Takazaki, K. Terasawa, K. Tsuji, K. Waki, H. Yamagata, H. Yamane, S. Yoshiki, R. Yoshihara, K. Yukawa, H. Zhong, H. Iwama, T. Endo, H. Ito, J. H. Hahn, H.-I. Kim, M.-Y. Eun, M. Yano, J. Jiang and T. Gojobori** (2002). The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature* **420**(6913): 312-316.
- Saylor, M. and R. Mansell** (1977). Hydroxycinnamoyl: coenzyme A transferase involved in the biosynthesis of kaempferol-3-(p-coumaroyl triglucoside) in *Pisum sativum*. *Z Naturforsch C.* **32**(9-10): 764-768.

- Schellenberger, A.** (1998). Enzymkatalyse - Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme (unter Mitarbeit von G. Fischer, G. Hübner und R. Ulbrich). *VEB Gustav Fischer Verlag, Jena*.
- Schmidt, S. W., K. Denzel, G. Schilling and G. G. Gross** (1987). Enzymatic-Synthesis of 1,6-Digalloylglucose from Beta-Glucogallin by Beta-Glucogallin -Beta-Glucogallin 6-O-Galloyltransferase from Oak Leaves. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **42**(1-2): 87-92.
- Schoch, G., S. Goepfert, M. Morant, A. Hehn, D. Meyer, P. Ullmann and D. I. Werck-Reichhart** (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* Is a 3-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **276**(39): 36566-36574.
- Sharp, P. M., E. Cowe, D. G. Higgins, D. C. Shields, K. H. Wolfe and F. Wright** (1988). Codon Usage Patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* - a Review of the Considerable within-Species Diversity. *Nucleic Acids Research* **16**(17): 8207-8211.
- Sharp, P. M. and W. H. Li** (1987). The Codon Adaptation Index - a Measure of Directional Synonymous Codon Usage Bias, and Its Potential Applications. *Nucleic Acids Research* **15**(3): 1281-1295.
- Sheahan, J. J.** (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **83**(6): 679-686.
- Shimada, M., H. Kuroda and T. Higuchi** (1973). Evidence for Formation of Methoxyl Groups of Ferulic and Sinapic Acids in Bambusa by Same O-Methyltransferase. *Phytochemistry* **12**(12): 2873-2875.
- Shirley, A. M. and C. Chapple** (2003). Biochemical Characterization of Sinapoylglucose:Choline Sinapoyltransferase, a Serine Carboxypeptidase-like Protein That Functions as an Acyltransferase in Plant Secondary Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **278**(22): 19870-19877 %R 10.1074/jbc.M302362200.
- Shirley, B. W., W. L. Kubasek, G. Storz, E. Bruggemann, M. Koornneef, F. M. Ausubel and H. M. Goodman** (1995). Analysis of *Arabidopsis* Mutants Deficient in Flavonoid Biosynthesis. *Plant Journal* **8**(5): 659-671.
- Shirsat, A., N. Wilford, R. Croy and D. Boulter** (1989). Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Molecular and General Genetics* **215**(2): 326-331.
- Smith, K. C. and T. C. V. Wang** (1989). RecA-Dependent DNA-Repair Processes. *Bioessays* **10**(1): 12-16.
- Smith, N. A., S. P. Singh, M.-B. Wang, P. A. Stoutjesdijk, A. G. Green and P. M. Waterhouse** (2000). Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**(6802): 319-320.

- St-Pierre, J. and V. De Luca** (2000). Chapter Nine: Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification fo the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Evolution of Metabolic Pathways*. **Volume 34**: 285-315.
- Stapleton, A. E.** (1992). Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions. *Plant Cell* **4**(11): 1353-1358.
- Steffens, J. C.** (2000). Acyltransferases in Protease's Clothing. *Plant Cell* **12**(8): 1253-1256.
- Stehle, F.** (2009). Struktur-Funktionsbeziehungen der Serin-Carboxypeptidase-ähnlichen Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase.
- Stehle, F., W. Brandt, J. Schmidt, C. Milkowski and D. Strack** (2008). Activities of Arabidopsis sinapoylglucose : malate sinapoyltransferase shed light on functional diversification of serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry* **69**(9): 1826-1831.
- Stehle, F., M. T. Stubbs, D. Strack and C. Milkowski** (2008). Heterologous expression of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase and characterization of the kinetic mechanism. *Febs Journal* **275**(4): 775-787.
- Stintzi, A., T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedemannmerdinoglu, S. Kauffmann, P. Geoffroy, M. Legrand and B. Fritig** (1993). Plant Pathogenesis-Related Proteins and Their Role in Defense against Pathogens. *Biochimie* **75**(8): 687-706.
- Stöckigt, J. and M. H. Zenk** (1974). Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. *FEBS Letters* **42**(2): 131-134.
- Strack, D.** (1980). Enzymatic synthesis of 1-sinapoylglucose by UDP-glucose:sinapic acid glycosyltransferase from cotyledons of Raphanus sativus. *Z für Naturforschung* **35**: 204-208
- Strack, D., M. Bokern, J. Berlin and S. Sieg** (1984). Metabolic activity of hydroxycinnamic acid glucose ester in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Z für Naturforschung* **39c**: 902-907.
- Strack, D. and W. Gross** (1990). Properties and Activity Changes of Chlorogenic Acid:Glucaric Acid Caffeoyltransferase From Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol.* **92**(1): 41-47.
- Strack, D., W. Gross, J. Heilemann, H. Keller and S. Ohm** (1988). Enzymic-Synthesis of Hydroxycinnamic Acid-Esters of Glucaric Acid and Hydroaromatic Acids from the Respective 1-O-Hydroxycinnamoylglucoside and Hydroxycinnamoyl-Coenzyme-a Thioester as Acyldonors with a Protein Preparation from *Cestrum elegans* Leaves. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **43**(1-2): 32-36.
- Strack, D., W. Gross, V. Wray and L. Grotjahn** (1987). Enzymic Synthesis of Caffeoylglucaric Acid from Chlorogenic Acid and Glucaric Acid by a Protein Preparation from Tomato Cotyledons. *Plant Physiol.* **83**(3): 475-478.

- Strack, D., J. Heilemann, B. Boehnert, L. Grotjahn and V. Wrayf** (1986). Accumulation and enzymatic synthesis of 2-O-acetyl-3-O-(p-coumaroyl)-meso-tartaric acid in spinach cotyledons. *Phytochemistry* **26**(1): 107-111.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**(8): 1596-1599.
- Tan, J. W., P. Bednarek, H. K. Liu, B. Schneider, A. Svatos and K. Hahlbrock** (2004). Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry* **65**(6): 691-699.
- Teissere, M., M. Borel, B. Caillol, J. Nari, A. M. Gardies and G. Noat** (1995). Purification and Characterization of a Fatty Acyl-Ester Hydrolase from Post-Germinated Sunflower Seeds. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* **1255**(2): 105-112.
- Terzaghi, W. B. and A. R. Cashmore** (1995). Light-Regulated Transcription. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**(1): 445-474.
- Teutschbein, J., W. Gross, M. Nimtz, C. Milkowski, B. Hause and D. Strack** (2010). Identification and Localization of a Lipase-like Acyltransferase in Phenylpropanoid Metabolism of Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Biological Chemistry* **285**(49): 38374-38381.
- Ulbrich, B., J. Stöckigt and M. H. Zenk** (1976). Induction by light of hydroxycinnamoyl-CoA-quinat-transferase activity in buckwheat hypocotyls. *Naturwissenschaften*. **63**: 484.
- Ulbrich, B. and M. H. Zenk** (1979). Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* **18**(6): 929-933.
- Ulbrich, B. and M. H. Zenk** (1980). Partial purification and properties of p-hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimate-p-hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* **19**(8): 1625-1629.
- Upton, C. and J. T. Buckley** (1995). A New Family of Lipolytic Enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* **20**(5): 178-179.
- van den Hazel, H. B., M. C. Kielland-Brandt and J. R. Winther** (1993). The propeptide is required for in vivo formation of stable active yeast proteinase A and can function even when not covalently linked to the mature region. *Journal of Biological Chemistry* **268**(24): 18002-18007.
- van Loon, L. C.** (1985). Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Molecular Biology* **4**(2-3): 111-116.
- Vicient, C. M. and M. Delseny** (1999). Isolation of Total RNA from *Arabidopsis thaliana* Seeds. *Analytical Biochemistry* **268**(2): 412-413.

- Villegas, R. J. and M. Kojima** (1986). Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. . *Journal of Biological Chemistry* **261** (19): 8729-8733
- Villegas, R. J. A., T. Shimokawa, H. Okuyama and M. Kojima** (1987). Purification and characterization of chlorogenic acid: Chlorogenate caffeoyl transferase in sweet potato roots. *Phytochemistry* **26**(6): 1577-1581.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol Plant* **3**(1): 2-20.
- Wallace, G. and S. C. Fry** (1994). Phenolic Components of the Plant-Cell Wall. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 151* **151**: 229-267.
- Wang, T., L. M. Iyer, R. Pancholy, X. Y. Shi and T. C. Hall** (2005). Assessment of penetrance and expressivity of RNAi-mediated silencing of the Arabidopsis phytoene desaturase gene. *New Phytologist* **167**(3): 751-760.
- Watzl, B. and G. Rechkemmer** (2001). Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau* **48**: 413-416.
- Weier, D.** (2006). Die Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase aus *Brassica napus*.
- Wesley, S. V., C. Helliwell, M.-B. Wang and P. Waterhouse** (2004). Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *RNA Interference, Editing, and Modification*: 117-129.
- Wesley, S. V., C. A. Helliwell, N. A. Smith, M. Wang, D. T. Rouse, Q. Liu, P. S. Gooding, S. P. Singh, D. Abbott, P. A. Stoutjesdijk, S. P. Robinson, A. P. Gleave, A. G. Green and P. M. Waterhouse** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* **27**(6): 581-590.
- Wink, M.** (1999). Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual plant reviews, part 2*.
- Yamamoto, E., G. H. Bokelman and N. G. Lewis** (1989). Phenylpropanoid metabolism in cell walls. Plant Cell Wall Polymers, Biogenesis and Biodegradation. *Am. Chem. Soc. ACS Symp.* **399**: 68-88.
- Zsebo, K. M., H. S. Lu, J. C. Fieschko, L. Goldstein, J. Davis, K. Duker, S. V. Suggs, P. H. Lai and G. A. Bitter** (1986). Protein Secretion from *Saccharomyces-Cerevisiae* Directed by the Prepro-Alpha-Factor Leader Region. *Journal of Biological Chemistry* **261**(13): 5858-5865.

A. Anhang

Tabelle A.1: Genutzte Oligonukleotide und deren Verwendungszweck

Bezeichnung	Sequenz von 5' nach 3'
Ableitung der SICGT-cDNA	
LFQFDGDSLSDTGNDGTR	GAYACRGGRAAYGAC GAYACYGGRAAYGAC GAYACRGGYAAYGAC GAYACYGGYAAYGAC GAYACRGGRAAYGAT GAYACYGGRAAYGAT GAYACRGGYAAYGAT GAYACYGGYAAYGAT
CCGLGGEYNYTES	GGRGARTAYAAYTAYAC GGYGARTAYAAYTAYAC
5'RACE	
CGTR1	TTTCAGCTCCTGGCTTACCACATCTC
CGTR2	AAGTAACTACTCGGGTCTGCACAAGC
Amplifizierung der Gesamtsequenz	
CGTcom_F	CATGGCATTGGGAATGAG
CGTcom_R	TGAATTCAAACACGACAGTT
Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	
CGT_pET_F	TCATCTAGAATGGATGATGATATGGTAAT
CGT_pET_R	TGAGCGGCCGCAACACGACAGTTCAATTGG
Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	
5'pDIO	TCAGCGGCCGCAAAAAAAAAATGGCATTGGGAATG
3'pDIO	TGATCTAGATCAAACACGACAGTTCAATTGG
Heterologe Expression in <i>N. benthamiana</i>	
CGTrbcs_F	TCATCTAGAGAAAATGGCATTGGGAATGAG
CGTrbcs_R	TGAGCGGCCGCTCAAACACGACAGTTCAATTGG
CGTrbcs_his_R	TGAGCGGCCGCAACACGACAGTTCAATTGG
Semiquantitative RT-PCR	
CGT_sRT_F	CATGGCATTGGGAATGAG
CGT_sRT_R	TGAATTCAAACACGACAGTT
SIEF1a_F	AACCCTCCTTGAGGCTCTTG
SIEF1a_R	TCCTTACCTGAACGCCTGTC
CGT RNAi Konstrukt	
CGT_RNAi_F	TCAGCTAGCCCATGGCAAGGCAAACCCATAGAG
CGT_RNAi_R	CGCAGAAGCCAGTAATAGCCCGGGGGATCCTCA

Amplifikation des *NPTII*-Gens in transformierten Pflanzen

NptII_F	TCTGCACCGGATCTGGATCG
NptII_R	ATCGCAAGACCGGCAACAGG

Amplifikation des *bar*-Gens in transformierten Pflanzen

bar_F	GACGCACAATCCCCTATCC
bar_R	ACTAGAACGCGTGATCTCAG

Genome Walking

GenWalk1	AGCTCCACAATAGCTCTCTCTCAAACAGTTTCC
GenWalk2	TAAGAGATGAAGCACTACCACTCTCATTCC

Realtime-PCR

RT_CGT_F	GAAATGCTGTCGCTCTTGGATT
RT_CGT_R	TGGCTTACCACATCTCCTGGA
EF1 α _F	GGTGGCGAGCATGATTTTGA
EF1 α _R	CGAGCCACCATGGAAAACAA

Mutagenese der Aminosäuresequenz

Ser27Ala_F	GACAGAATTTTTTCAGTTTGGTGATGCACTTTCCGATACT GGAAACTGTTTGA
Ser27Ala_R	TCAAACAGTTTCCAGTATCGGAAAGTGCATCACCAAAC TGAAAAATTCTGTC
Asp162Ala_F	TAATTGGAGAAATCGGAGGAGATGCAGTTACTTATGGA TTTAAGCAAGGC
Asp162Ala_R	GCCTTGCTTAAATCCATAAGTAACTGCATCTCCTCCGA TTTCTCCAATTA
Asp328Ala_F	GAGTAGTTACTTAAGTTGGGCAGGAAGTCATTTGACAC
Asp328Ala_R	GTGTCAAATGACTTCCTGCCCAACTTAAGTAACTACTC
His331Ala_F	CCGAGTAGTTACTTAAGTTGGGATGGAAGTGCATTGAC ACAAAAGGCATA
His331Ala_R	TATGCCTTTTGTGTCAATGCACTTCCATCCCAACTTAAG TAACTACTCGG

Abbildung A.1: Sequenzvergleich der genomischen *SICGT*-Sequenz mit der *full length* cDNA der *SICGT*. Identische Bereiche sind blau hervorgehoben.

```

SICGTcDNA      1 -----ATGGCATTGGGAATGAGAGTGGTAGTGCCTTCATCTCTTAATCAGTTTGTGCTTCTTC
SICGT          1 CACTAGCGATTTCATGGCATTGGGAATGAGAGTGGTAGTGCCTTCATCTCTTAATCAGTTTGTGCTTCTTC

SICGTcDNA      59 AACTGATCAAAGGAGATGATGATATGGTAATAAAGCTTGAAGAACCAGAAATTGAAGAAATCGCGAATGA
SICGT          71 AACTGATCAAAGGAGATGATGATATGGTAATAAAGCTTGAAGAACCAGAAATTGAAGAAATCGCGAATGA

SICGTcDNA      129 CAGAATTTTTCAGTTTGGTGATTCACTTTCGGATACTGGAACTGTTTGAGAGAGAGCTATTGTGGAGCT
SICGT          141 CAGAATTTTTCAGTTTGGTGATTCACTTTCGGATACTGGAACTGTTTGAGAGAGAGCTATTGTGGAGCT

SICGTcDNA      199 CAAACTAAAACCGGAAAACCTTCCTTACGGAATGAATTTTACCAGAACGCAACTGGACGTTGTTCTGATG
SICGT          211 CAAACTAAAACCGGAAAACCTTCCTTACGGAATGAATTTTACCAGAACGCAACTGGACGTTGTTCTGATG

SICGTcDNA      269 GATTCATCATCCTTGATTACATAG-----
SICGT          281 GATTCATCATCCTTGATTACATAGGTTGATATTCAAAACTACTATACTCATATATAATATTGATGATT

SICGTcDNA      293 -----CGATGGAATGTGGTCTTCCTCTCCT
SICGT          351 TTCTTTATTTAATTTGCGTCTCTCTCGTATTGTAATATATACAGCGATGGAATGTGGTCTTCCTCTCCT

SICGTcDNA      318 AAATCCGTCCTTGAAGAAAATGCAGATTTTAGCCATGGTGTGAATTTCCGCCGTATCAGGAGCTACTGCT
SICGT          421 AAATCCGTCCTTGAAGAAAATGCAGATTTTAGCCATGGTGTGAATTTCCGCCGTATCAGGAGCTACTGCT

SICGTcDNA      388 TTATCAGCGGAATACCTCATATCGAGGGACATCGCTATGCTTTCACAAACAGTTCATTAAGTGTTCAGA
SICGT          491 TTATCAGCGGAATACCTCATATCGAGGGACATCGCTATGCTTTCACAAACAGTTCATTAAGTGTTCAGA

SICGTcDNA      458 TCGGATGGATGCTCTTCTTATTTCAAATCTGTTTGTCTCCAATG-----
SICGT          561 TCGGATGGATGCTCTTCTTATTTCAAATCTGTTTGTCTCCAATGTAATCCAATGGTAATTAATTACTCTC

SICGTcDNA      500 -----ATTGCGCAAA
SICGT          631 TACTTATTCATAACAATTATAAGCTAACTATTGACAGTTGAATGTTACTTGTGTTGCTAGATTGCGCAAA

SICGTcDNA      510 ATATTTGAAAAATTCACTTTTCTTAATTTGGAGAAAATCGGAGGAGATGACGTTACTTATGGATTTAAGCAA
SICGT          701 ATATTTGAAAAATTCACTTTTCTTAATTTGGAGAAAATCGGAGGAGATGACGTTACTTATGGATTTAAGCAA

SICGTcDNA      580 GGCAAACCCATAGAGGAGGTGCGAAGAATAGTGCCTGATATTGTGAAAAACATCATTCTGTTTAGA-
SICGT          771 GGCAAACCCATAGAGGAGGTGCGAAGAATAGTGCCTGATATTGTGAAAAACATCATTCTGTTTAGAG

SICGTcDNA      -----
SICGT          841 TAAGTGTTTTTTTTATTATTCTTCCTGTCATTAAAAGAATAGCTTCAAATTCGATTCTATTGATGATTGT

SICGTcDNA      649 -----ACAGTCATTGGTTTTGGGGCTACTCGAATTTTAGTTCCTGGTAATTTTCT
SICGT          911 CATTTTCTCTTCTTGAGACAGTCATTGGTTTTGGGGCTACTCGAATTTTAGTTCCTGGTAATTTTCTCT

SICGTcDNA      700 TCAGGTTGTTTCCCAATTATACTAACGTTTACATGAATGATTCCTCAACTGTCTACGATGAGTACCATT
SICGT          981 TCAGGTTGTTTCCCAATTATACTAACGTTTACATGAATGATTCCTCAACTGTCTACGATGAGTACCATT

SICGTcDNA      770 GCGCGGAAGAATGGAACAATTTTACAATCTCTTATAACAATCTTCTGCAACAATCCATTATGAGCTGAA
SICGT          1051 GCGCGGAAGAATGGAACAATTTTACAATCTCTTATAACAATCTTCTGCAACAATCCATTATGAGCTGAA

SICGTcDNA      840 CGAAGAGTATCCAAACATTTCAATTAATTTACGGCGATTACTACAATGCCTATTACTGGCTTCTGCGAAAT
SICGT          1121 CGAAGAGTATCCAAACATTTCAATTAATTTACGGCGATTACTACAATGCCTATTACTGGCTTCTGCGAAAT

SICGTcDNA      910 GCTGTCGCTCTTG-----
SICGT          1191 GCTGTCGCTCTTGTTGAGTGATATGACTAATTTCAAGGAGTTCTCAATTTAAATATTAAGCGTGAT

SICGTcDNA      924 -----GATTCAATAAAAAGACACTACAGATATCATGTTGTGGAATAG
SICGT          1261 TTACTGACCGACGAGTTCTTTTTCCAGGATTCAATAAAAAGACACTACAGATATCATGTTGTGGAATAG

SICGTcDNA      965 GAGGAGAATATAACTACCCGAATCCAGGAGATGTGGTAAGCCAGGAGCTGAAAAGGCTTGTGCGAGACC
SICGT          1331 GAGGAGAATATAACTACCCGAATCCAGGAGATGTGGTAAGCCAGGAGCTGAAAAGGCTTGTGCGAGACC

SICGTcDNA      1035 GAGTAGTTACTTAAGTTGGGATGGAAGTCATTTGACACAAAAGGCATATGGTTGGATAACAAAATGGCTA
SICGT          1401 GAGTAGTTACTTAAGTTGGGATGGAAGTCATTTGACACAAAAGGCATATGGTTGGATAACAAAATGGCTA

SICGTcDNA      1105 ATTGATGACATTTTACCCAATTGAACTGTCGTGTTTGA
SICGT          1471 ATTGATGACATTTTACCCAATTGAACTGTCGTGTTTGA

```

Tabelle A.2: Detaillierte Auflistung der putativen *cis*-regulatorischen Elemente, die durch Analyse eines etwa 1 kb großen Bereiches stromaufwärts des ATGs mittels der Software PLACE und PlantCARE identifiziert wurden.

Faktorname	Sequenz	Anz	(+)	(-)	Bemerkungen
10PEHVPSBD	TATTCT	1	0	1	psbD; chloroplast gene expression; circadian rhythms; light regulation
300ELEMENT	TGHAAARK	2	2	0	hordein; gliadin; glutenin; seed
ABRERATCAL	MACGYGB	2	1	1	calcium-response
ACGTATERD1	ACGT	6	3	3	etiolation-induced expression of <i>erd1</i> (early responsive to dehydration)
ACGTCBOX	GACGTC	2	1	1	C-box; ACGT element; seed
AMYBOX2	TATCCAT	1	0	1	amylase box; amylase element; seed
ANAERO1CONSENSUS	AAACAAA	2	1	1	involved in the fermentative pathway; anaerobic
ARR1AT	NGATT	8	3	5	ARR1; Response regulator
BOXIINTPATPB	ATAGAA	2	1	1	plastid <i>atpB</i> gene promoter
BS1EGCCR	AGCGGG	1	1	0	cinnamoyl-CoA reductase; vascular; BS1; stem
CAATBOX1	CAAT	13	6	7	CAAT promoter consensus sequence, seed phosphoenolpyruvate carboxylase; mesophyll; CACT
CACTFTPPCA1	YACT	12	6	6	CACT
CBFHV	RYCGAC	2	1	1	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature
CCAATBOX1	CCAAT	3	1	2	HSE (Heat shock element)
CGACGOSAMY3	CGACG	5	4	1	amylase
CGCGBOXAT	VCGCGB	10	5	5	CGCG box; calmodulin
CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	1	0	1	circadian; light; Lhc; leaf; shoot Core CRT/DRE motif; AP2 transcriptional activator
CRTDREHVCBF2	GTCGAC	2	1	1	HvCBF2; cold
CURECORECR	GTAC	4	2	2	copper-response element, oxygene response
DOFCOREZM	AAAG	13	6	7	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot bZIP transcription factors binding core sequence, embryo specific
DPBFCOREDCCDC3	ACACNNG	2	1	1	
E2FCONSENSUS	WTTSSCSS	2	0	2	E2F consensus sequence
EBOXBNNAPA	CANNTG	6	3	3	E-box of <i>napA</i> storage-protein; seed Consensus motif of two enhancer elements, EE-1 and EE-2; periplasmic carbonic anhydrase
EECCRAH1	GANTTNC	2	0	2	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot
GATABOX	GATA	6	3	3	
GCCCORE	GCCGCC	2	1	1	ethylene response
GT1CONSENSUS	GRWAAW	6	4	2	GT-1 binding site; light-regulated genes
GTGANTG10	GTGA	7	3	4	pollen; pectate lyase;
HEXAMERATH4	CCGTCG	2	0	2	hexamer motif; histone H4 promotor, meristem conserved sequence upstream of light-regulated genes
IBOXCORE	GATAA	2	1	1	initiator; light-responsive transcription; TATA-less promoter
INRNTPSADB	YTCANTYY	2	1	1	
LTRECOREATCOR15	CCGAC	1	1	0	ABA responsive; low temperature; cold; drought; matrix attachment region; scaffold attachment region
MARTBOX	TTWTWTTWTT	1	1	0	
MYB1AT	WAACCA	2	1	1	MYB recognition site
MYB2AT	TAACTG	1	1	0	binding site for ATMYB2
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	2	2	0	MYB recognition site

MYBCORE	CNGTTR	3	1	2	MYB recognition site
MYBST1	GGATA	1	1	0	Core motif of MybSt1 binding site
MYCCONSUSUSAT	CANNTG	6	3	3	MYC recognition site
NAPINMOTIFBN	TACACAT	1	0	1	napin; 2S albumin; seed; storage protein
NODCON1GM	AAAGAT	3	0	3	nodulin consensus sequence
NODCON2GM	CTCTT	1	1	0	nodulin consensus sequence
NTBBF1ARROLB	ACTTTA	2	2	0	NtBBF1 binding site, Auxin induction
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	3	0	3	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	1	1	0	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
POLASIG1	AATAAA	4	1	3	poly A signal
POLASIG2	AATAAAA	1	0	1	poly A signal
POLASIG3	AATAAT	8	4	4	poly A; polyadenylation
POLLEN1LELAT52	AGAAA SCGAYNRNNN NNNNNNNNNN NNHD	6	3	3	pollen specific activation lat52 gene; tomato
PRECONSCRHSP70A	AGAAA SCGAYNRNNN NNNNNNNNNN NNHD	1	1	0	HSP; chlorophyl
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	2	1	1	alpha-amylase; sugar repression; seed
RAV1AAT	CAACA	2	1	1	AP2-like and B3-like domain, shoot, leave, root
RHERPATEXPA7	KCACGW	1	1	0	root hair-specific cis-elements
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	13	7	6	rolD promotor, root
S1FBOXSORPS1L21	ATGGTA	1	1	0	S1F box; plastid protein
S1FSORPL21	ATGGTATT	1	1	0	S1F binding site; plastid protein
SEF1MOTIF	ATATTTAWW	1	1	0	SEF1 binding motif, storage protein, seed
SEF4MOTIFGM7S	RTTTTTR	2	0	2	SEF4 binding site; storage protein, seed cytochrome; TCP-domain; meristem; oxidative phosphorylation
SITEIIATCYTC	TGGGCY	1	1	0	phosphorylation
SORLIP1AT	GCCAC	1	0	1	light-induced cotyledon and root genes
SORLIP2AT	GGGCC	4	2	2	light-induced, phyA promotor
TAAAGSTKST1	TAAAG	3	0	3	guard cell-specific gene expression
TATABOX3	TATTAAT	2	1	1	TATA box
TATABOX4	TATATAA	1	1	0	TATA box
TATABOX5	TTATTT	6	4	2	TATA box
TATABOXOSPAL	TATTTAA	1	1	0	DNA binding and bending
TATCCAOSAMY	TATCCA	1	0	1	alpha-amylase; MYB protein
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	TATCCAY	1	0	1	amylase; sugar repression
TE2F2NTPCNA	ATTCCCGC	1	0	1	transcriptional activation in actively dividing cells
TRANSINITMONOCOTS	RMNAUGGC	1	0	1	translational initiation
UP1ATMSD	GGCCCAWWW	1	0	1	axillary bud outgrowth
WBOXHVISO1	TGACT	1	0	1	W-box element, sugar, isoamylase
WBOXNTERF3	TGACY	2	0	2	W-box element, wound-induced core of TGAC-containing W-box, pathogen-induced
WRKY71OS	TGAC	2	0	2	

Tabelle A.3: Zusammenfassung der für den phylogenetischen Baum verwendeten Proteine. Verzeichnet sind die bei UniProt⁷ angegebene ID-Bezeichnung, mögliche Funktionen und die Länge der Aminosäuresequenz.

RefSeq	UniProt ID	Beschreibung	Funktion	Species	Länge
XP002330165	B9N4J0	predicted protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Populus trichocarpa</i>	373 As
XP002330166	B9N4J1	predicted protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Populus trichocarpa</i>	363 As
XP002330170	B9N4J7	predicted protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Populus trichocarpa</i>	373 As
XP002528395	B9SQX6	Alpha-L-fucosidase 2, putative	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Ricinus communis</i>	379 As
XP002512444	B9RFC5	Alpha-L-fucosidase 2, putative	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Ricinus communis</i>	367 As
XP002299039	B9GGK2	predicted protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Populus trichocarpa</i>	367 As
XP002319509	B9I7H4	predicted protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Populus trichocarpa</i>	379 As
XP002279349	D7U9W3	hypothetical protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Vitis vinifera</i>	374 As
XP002457133	C5XL11	hypothetical protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Sorghum bicolor</i>	381 As
XP002450809	C5Y2T2	hypothetical protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Sorghum bicolor</i>	387 As
XP002452415	C5XX77	hypothetical protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Sorghum bicolor</i>	399 As
NP001152155	B6U9Q9	esterase, putative	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Zea mays</i>	386 As
NP001151231	B6TY85	Alpha-L-fucosidase 2, putative	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Zea mays</i>	386 As
AAW88320	Q3MKY2	Acetyljmalan acetylerase	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Rauvolfia serpentina</i>	387 As
ABA93963	Q2R3H2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Oryza sativa</i>	373 As
EAY81107	A2ZES3	hypothetical protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Oryza sativa</i>	364 As
EAZ18532	A3CBR9	hypothetical protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	<i>Oryza sativa</i>	364 As

⁷ <http://www.uniprot.org/>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Strack und Herrn Dr. Carsten Milkowski vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und Beratung sowie für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Bei Frau Dr. Bettina Hause möchte ich mich ganz herzlich für die zahlreichen fachlichen Ratschläge und den unermüdlichen Beistand bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Dr. Thomas Vogt und Dr. Alfred Baumert gilt mein Dank für die Hilfe bei den proteinbiochemischen Arbeiten, insbesondere bei der Reinigung des Enzyms.

Silvia Vetter und Ingrid Otschik danke ich für die tatkräftige Unterstützung, insbesondere bei der zeitaufwändigen Ernte der Tomatensamen.

Ein großes Dankeschön geht an Anja Henning für die Betreuung und Hilfe an den HPLC-Geräten.

Hagen Stellmach möchte ich meinen Dank für die Betreuung an den Mikroskopen aussprechen.

Ich bedanke mich außerdem bei den Gärtnern, besonders Petra Jansen und Phillip Plato, die immer ein wachsames Auge über die Pflanzen hatten und mit denen eine gute Zusammenarbeit möglich war.

Der gesamten Abteilung Sekundärstoffwechsel möchte ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit danken. Für die aufmunternden Worte und anregenden Gespräche sowie die lustigen Mittagspausen danke ich insbesondere Jessica, Karina, Anja, Daniela, Ulrike und Hagen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung und den nie endenden Zuspruch während des gesamten Studiums. Ein großer Dank geht auch an Jana für die Korrektur meines oft bescheidenen Ausdruckes und die aufmunternden Worte. Vielen Dank an Alex für die Kontrolle der Rechtschreibung. Danke an Steffen, weil er all meine Launen tapfer ertragen und nie den Glauben an mich verloren hat. Und nicht zuletzt Danke an Steve, Dominic, Basti, Mo, Golle, Sabrina, Nicole, Sandra, Flo, Maria, Claudia, Nico, Juliane, Babett und Thekla, die besten Freunde der Welt.

Ebenso sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dieses Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie finanziert.

Danke!

Publikationen, Poster und Vorträge

Publikationen:

J. Teutschbein, W. Gross, M. Nimtz, C. Milkowski, B. Hause and D. Strack (2010).
*Identification and Localization of a Lipase-like Acyltransferase in Phenylpropanoid Metabolism of Tomato (*Solanum lycopersicum*)*.
Journal of Biological Chemistry **285**(49): 38374-38381.

Präsentationen:

J. Teutschbein, A. Baumert, C. Milkowski, D. Strack (2009)
*Cloning, Heterologous Expression and Characterization of Chlorogenic Acid:Glucaric Acid Caffeoyltransferase from Tomato (*Solanum lycopersicum*)*
Botanikertagung 2009, Leipzig, 6.-9. September 2009 (Poster)

J. Teutschbein, A. Baumert, C. Milkowski, D. Strack (2009)
*Cloning, Heterologous Expression and Characterization of Chlorogenic Acid:Glucaric Acid Caffeoyltransferase from Tomato (*Solanum lycopersicum*)*
Plant Science Student Conference, Halle (Saale), 23.-26. Juni 2009 (Poster)

J. Teutschbein, A. Baumert, C. Milkowski, D. Strack (2008)
*Cloning and Heterologous Expression of Chlorogenic Acid:Glucaric Acid Caffeoyltransferase from Tomato (*Solanum lycopersicum*)*
The 6th Kurt Mothes Workshop Secondary Metabolism
Jena, 18.-19. September 2008 (Vortrag)

Lebenslauf:

Persönliche Daten

Name: Jenny Teutschbein
Anschrift: Gerhard-Lichtenfeld-Weg 6
06124 Halle
Geburtsdatum: 08.03.1982
Geburtsort: Markranstädt

Ausbildung

Oktober 2000 – April 2006 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Hauptfach: Pflanzenphysiologie
Nebenfächer: Genetik, Biochemie, Phytopathologie
Abschluss: Diplom-Biologin (1,8)

Bis Juli 2000 Comenius-Gymnasium Stendal
Abschluss: Abitur (1,6)

Berufliche Tätigkeit

seit Mai 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Agrar- und
Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg

Mai 2006 - April 2010 Doktorandin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
Titel der Doktorarbeit: „Die Chlorogensäure:Glukarsäure
Caffeoyltransferase (CGT) aus *Solanum lycopersicum*“
Betreuer: Prof. Dr. Dieter Strack

Mai 2005 – April 2006

Anfertigung der Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie,
Arbeitsgruppe „Induzierte Pathogenabwehr“
Titel der Diplomarbeit: „Kartierung und Charakterisierung von Nichtwirt-Resistenzgenen in *Arabidopsis thaliana*“
Betreuer: Prof. Dr. Dierk Scheel und Dr. Sabine Rosahl

August 2004 –
September 2004

Studienbegleitendes Praktikum am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertationsschrift erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe. Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle,